

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 9
сентябрь
2024



НАУКА
— 1727 —



Учредитель:
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
им. И.М. СЕЧЕНОВА

Russian Journal of Physiology

ISSN0869-8139, e-ISSN2658-655X

Основан И.П. Павловым в 1917г.

Издается 12 номеров в год

Журнал издается при поддержке

*Отделения физиологических наук РАН и Российского физиологического общества
им.И.П. Павлова*

*Главный редактор академик РАН Л.Г. Магазаник (ИЭФБ РАН)
Заместитель главного редактора д.б.н. А.В. Зайцев (ИЭФБ РАН)*

Редакционная коллегия

Антонов С.М.(ИЭФБ РАН), **Балабан П.М.**(ИВНД и НФ РАН),
Безпрозванный И.Б. (СПбПУ, Санкт-Петербург, Россия;
UT Southwestern Medical Center, Даллас, США),
Брежестовский П.Д. (INSERM, Aix Marseille Université, Марсель, Франция),
Гайнетдинов Р.Р. (СПбГУ), **Гамбарян С.П.** (ИЭФБ РАН),
Герасименко Ю.П. (ИФ РАН, Санкт-Петербург, Россия; University of Louisville,
Луисвилл, США), **Глазова М.В.** (ИЭФБ РАН),
Гуляева Н.В. (ИВНД и НФ РАН), **Зефилов А. Л.** (КазГМУ),
Иванова Л.Н. (ИЦГ СО РАН), **Калуев А.В.** (СПбГУ),
Колесников С.С. (ИБК РАН), **Марков А.Г.** (СПбГУ),
Наливаева Н.Н. (University of Leeds, Великобритания),
Салмина А.Б. (НЦН, Kanazawa University, Канадзава, Япония;
КрасГМУ, Красноярск; НЦН, Москва, Россия), **Семьянов А.В.** (ИБХ РАН),
Скребицкий В.Г. (НЦН), **Сороко С.И.** (ИЭФБ РАН),
Степаничев М.Ю. (ИВНД и НФ РАН), **Ткачук В.А.** (МГУ), **Фирсов М.Л.** (ИЭФБ РАН),
Шенкман Б.С. (ИМБП РАН)

Зав. редакцией Кручинина О.В.(ИЭФБ РАН)

Сайт журнала: <https://rusjphysiol.org/index.php/rusjphysiol>

Москва
ФГБУ «Издательство «Наука»

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Астроцитарный маркер GFAP в глиоцитах периферической нервной системы
Е. С. Петрова, Е. А. Колос 1277
- Роль серотонинергической системы в функциональном восстановлении после травмы спинного мозга
С. П. Коновалова, Ю. И. Сысоев, А. Ветлугина, К. А. Арсентьев, П. Е. Мусиенко 1294
- Проекционные нейроны префронтальной коры, их участие в формировании различных форм поведения и экспрессия в них нейротрофического фактора мозга
У. С. Дрозд, Я. А. Фрик, А. В. Смагин, Д. А. Ланиаков 1316
-

Экспериментальные статьи

- Природа спонтанной тонической активности камбаловидной мышцы крысы в условиях опорной разгрузки, выявленная при использовании CLP290, нового активатора калий-хлоридного ко-транспортера спинного мозга
В. Е. Калашиников, К. В. Сергеева, О. В. Туртикова, С. А. Тыганов, Т. М. Мирзоев, Б. С. Шенкман 1337
- Влияние форсированного плавания на выполнение теста «избавление подныриванием»
М. А. Тур, И. В. Белозерцева 1349
- Экспрессия эффекторов апоптоза, аутофагии и некроптоза в клетках гиппокампа крыс после избыточного потребления F^-
О. В. Надей, Н. И. Агалакова 1362
- Экспрессия парвальбумина, остеопонтина и глипикана 4 в нейронах отдаленного от эпицентра травматического повреждения поясничного отдела спинного мозга
О. Н. Тутова, И. М. Кабдеш, Я. О. Мухамедишина, Ю. А. Чельшев 1377
- 2-АРВ предотвращает атрофические изменения и меняет клеточный сигналинг при функциональной разгрузке *M. Soleus* крыс
К. А. Зарипова, Р. О. Боков, К. А. Шарло, С. П. Белова, Т. Л. Немировская 1390
- D-серин снижает уровень внеклеточного серотонина в медиальной префронтальной коре и усиливает формирование реакции страха у крыс
Н. Б. Саульская, М. А. Сусорова 1406
- Взаимосвязь вязкости крови и артериального давления у нормотензивных и спонтанно гипертензивных крыс
А. М. Анищенко, А. В. Сидехменова, О. И. Алиев, О. А. Уляхина, О. И. Дунаева, М. Б. Плотников 1420
- Участие Ca^{2+} -акцепторных белков в механизмах экзо-эндоцитозного цикла синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях соматической мускулатуры дождевого червя *Lumbricus terrestris*
Л. Ф. Нуруллин, Н. Д. Алмазов, Е. М. Волков 1430

Вызванная синхронизация тета-ритма ЭЭГ при подготовке саккад и антисаккад по памяти в норме и у больных с клинически высоким риском шизофрении

А. В. Павлов, М. В. Славущая, М. А. Омельченко, А. В. Котенев, И. С. Лебедева 1440

Изменения экспрессии апоптоз-ассоциированных белков в височной коре и гиппокампе крыс при длительном киндинге и их коррекция с помощью минолексина

Е. Д. Бажанова, А. А. Козлов, Ю. О. Соколова, А. А. Супонин, Е. О. Демидова 1455

Упруго-эластические свойства клеточной поверхности и метаболический профиль эмбриональной первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа в условиях блокады P2X3-рецептора

А. С. Зеленцова, В. С. Шмигерева, Ю. В. Степенко, М. Ю. Скоркина, А. В. Дейкин 1475

Участие адренорецепторов в механизмах возникновения патологического сердечного ритма, вызванного у новорожденных крысят введением хлорида никеля

С. В. Кузнецов, Н. Н. Кузнецова 1488

Влияние социальной изоляции и обогащенной среды на активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы, болевую чувствительность и поведение крыс после ульцерогенного стрессора

*Н. И. Ярушкина, М. Ю. Зенько, О. Ю. Морозова, О. П. Комкова, К. А. Баранова,
С. Е. Жуйкова, Е. А. Рыбникова, Л. П. Филаретова* 1510

Памяти профессора Нины Константиновны Поповой

(10 февраля 1929 г. – 28 сентября 2024 г.) 1529

CONTENTS

Reviews

- Astrocyte Marker GFAP in Gliocytes of the Peripheral Nervous System
E. S. Petrova, and E. A. Kolos 1277
- The Role of the Serotonergic System in Functional Recovery after Spinal Cord Injury
S. P. Konovalova, Yu. I. Sysoev, A. Vetlugina, K. A. Arsentiey, and P. E. Musienko 1294
- Projection Neurons of the Prefrontal Cortex, their Participation in the Formation of Various Forms of Behavior and Expression in them of Brain-derived Neurotrophic Factor
U. S. Drozd, Y. A. Frik, A. V. Smagin, and D. A. Lanshakov 1316
-

Experimental articles

- An Investigation of the Spontaneous Tonic Activity of the Rat Soleus Muscle Following Hindlimb Suspension, with a Focus on the Effects of Clp290, a Novel Activator of the Spinal Cord Potassium-Chloride Co-Transporter
V. E. Kalashnikov, K. V. Sergeeva, O. V. Turtikova, S. A. Tyganov, T. M. Mirzoev, and B. S. Shenkman 1337
- Effect of Forced Swimming on the Performance of the "Water Escape Test"
M. A. Tur, and I. V. Belozertseva 1349
- Expression of Apoptosis, Autophagy and Necroptosis Effectors in Cells of Rat Hippocampus after Excessive F- Consumption
O. V. Nadei, and N. I. Agalakova 1362
- Expression of Parvalbumin, Osteopontin and Glypican 4 in Neurons of Lumbar Region Distant from the Epicenter of Traumatic Spinal Cord Injury
O. N. Tutova, I. M. Kabdesh, Ya. O. Mukhamedshina, and Yu. A. Chelyshev 1377
- 2-APB prevents atrophic changes and alters cellular signalling during unloading of rat m. soleus
K. A. Zaripova, R. O. Bokov, K. A. Sharlo, S. P. Belova, and T. L. Nemirovskaya 1390
- D-Serine Reduces Extracellular Serotonin Level in the Medial Prefrontal Cortex and Enhances the Formation of Fear Response in Rats
N. B. Saulskaya, and M. A. Susorova 1406
- Relationship of Blood Viscosity and Blood Pressure in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats
A. M. Anishchenko, A. V. Sidekhmenova, O. I. Aliev, O. A. Ulyakhina, O. I. Dunaeva, and M. B. Plotnikov 1420
- Participation of Ca²⁺-Acceptor Proteins in the Mechanisms of the Exo-Endocytic Cycle of Synaptic Vesicles in the Motor Nerve Endings of The Somatic Musculature of the Earthworm *Lumbricus terrestris*
L. F. Nurullin, N. D. Almazov, and E. M. Volkov 1430
- Evoked Synchronization of Theta EEG Rhythm during Preparation of Memory-Guided Saccades and Antisaccaded in Normals and in Patients with Clinically High Risk for Schizophrenia
A. V. Pavlov, M. V. Slavutskaya, M. A. Omelchenko, A. V. Kotenev, and I. S. Lebedeva 1440

Changes in the Expression of Apoptosis-Associated Proteins in the Temporal Cortex and Hippocampus of Rats During Long-Term Kindling and Their Correction with Minolexin <i>E. D. Bazhanova, A. A. Kozlov, Yu. O. Sokolova, A. A. Suponin, and E.O. Demidova</i>	1455
Elastic Properties of the Cell Surface and Metabolic Profile of an Embryonic Primary Mixed Culture of Hippocampal Neurons under Conditions of P2X3 Receptor Blockade <i>A. S. Zelentsova, V. S. Shmigerova, Y. V. Stepenko, M. Yu. Skorkina, and A. V. Deykin</i>	1475
Participation of Adrenoreceptors in the Mechanisms of Pathologic Cardiac Rhythm Induced in Newborn Rats by Nickel Chloride Administration <i>S. V. Kuznetsov, and N. N. Kuznetsova</i>	1488
The Influence of Social Isolation and Enriched Environment on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical (HPA) Axis, Pain Sensitivity, and Behavior in Rats after Exposure to an Ulcerogenic Stressor <i>N. I. Yaruskina, M. Yu. Zenko, O. Yu. Morozova, O. P. Komkova, K. A. Baranova, S. E. Zhuikova, E. A. Rybnikova, and L. P. Filaretova</i>	1510
In Memory of Professor Nina Konstantinovna Popova <i>(February 10, 1929 – September 28, 2024)</i>	1529

ОБЗОРЫ

АСТРОЦИТАРНЫЙ МАРКЕР GFAP В ГЛИОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2024 г. Е. С. Петрова^{1,*}, Е. А. Колос¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: iempes@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.07.2024 г.

После доработки 19.08.2024 г.

Принята к публикации 20.08.2024 г.

Исследование глиальных клеток периферической нервной системы (ПНС) является актуальной проблемой современной нейробиологии. Целью настоящей работы явилось обобщение собственных и литературных данных о распределении глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в клетках глии ПНС. Рассматривались особенности экспрессии GFAP в глии энтеральной нервной системы, спинномозгового ганглия и периферических нервных проводников. Сравнительное исследование разных популяций глиоцитов ПНС позволило заключить, что белок промежуточных филаментов GFAP распределяется в них по-разному. Анализ литературы показал, что несмотря на то, что данный белок широко применяется в качестве молекулярного маркера глиальной активации, до сих пор отсутствует понимание точных механизмов участия GFAP в глиальном реактивном ответе. Описанные особенности GFAP-содержащих глиоцитов различных отделов ПНС демонстрируют функциональный полиморфизм этого белка. Его свойство экспрессироваться в периферической глии в ответ на повреждение нуждается в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: глиальный фибриллярный кислый белок, периферическая нервная система, спинномозговой ганглий, нерв, ганглиозные сплетения стенки кишки, регенерация, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0869813924090015, **EDN:** AKRXIX

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большое число нейробиологических исследований касается клеток глии. Особое внимание уделяется метаболическим взаимодействиям между глиальными клетками (астроцитами, олигодендроцитами и микроглией) и нейронами, особенно в процессе старения и развития нейродегенеративных заболеваний. Большое значение для ЦНС имеют нейрон-астроцитарные взаимодействия. Известно, что астроцитарная глиа обеспечивает нормальное функционирование нейронов, их защиту от токсичности, регулирует синаптическую активность, составляет основу барьерной системы мозга, обеспечивает метаболизм [1–3].

Общеизвестно свойство астроцитов экспрессировать белок промежуточных филаментов – глиальный кислый фибриллярный белок (GFAP), который в течение многих десятилетий применяется как маркер астроцитарной глии. Одной из основных его функций считается поддержание структурной целостности глиальных клеток ЦНС,

что обеспечивается связыванием промежуточных филаментов с другими компонентами цитоскелета – микротрубочками и микрофиламентами, а также плазматической и ядерной мембранами. Кроме этого, промежуточные филаменты играют важную роль во внутриклеточном распределении органелл цитоплазмы. Использование нокаутных по GFAP животных позволило выявить участие этого белка в формировании гемато-энцефалического барьера, в процессах миелинизации и синаптогенеза, в регуляции нейрон-глиальных взаимоотношений [4, 5]. Меньшее внимание уделяется исследованиям нейрон-глиальных взаимодействий в органах периферической нервной системы (ПНС).

В ряде обзорных статей авторы сравнивают глиоциты ПНС с астроглией. Цель таких работ заключается в использовании обширных знаний об астроцитах для изучения новых аспектов клеток периферической глии [6]. Авторы рассматривают особенности химических мессенджеров тех и других глиоцитов, отмечают использование ими кальциевых волн для межклеточной сигнализации, описывают изменения при патологических состояниях [3, 6]. Эти сравнения проводятся на примере клеток-сателлитов чувствительных ганглиев и астроцитов и не касаются других популяций периферической глии. Тем не менее актуальность изучения молекулярно-клеточных механизмов регуляции функций ПНС, в частности, нейрон-глиальных взаимодействий весьма высока, поскольку касается таких важных аспектов, как проблема боли, восстановление периферических нервных проводников, вопросов влияния вегетативных ганглиев на развитие патологических процессов в разных органах (например, при сердечной недостаточности, циррозе печени, патологии кишечника и др.). Для решения этих проблем необходимо углубленное изучение морфофункциональных особенностей глиальных клеток ПНС, их функциональных белков и участия последних в нейрон-глиальных взаимодействиях. Одним из таких белков является GFAP. Целью настоящего обзора явилось обобщение собственных и литературных данных о распределении GFAP в глиальных клетках ПНС.

Краткая характеристика глиального фибриллярного кислого белка

GFAP является основным компонентом промежуточных филаментов цитоскелета астроцитов и считается классическим маркером астроглии. Данные о структурной организации его молекул, изоформах, свойствах и функциях, полученные за последние полвека, обобщены в большом числе отечественных и зарубежных обзоров [2, 7–10]. Показано, что в клетках, находящихся на разных стадиях развития, и при нейродегенеративных заболеваниях GFAP присутствует в разных изоформах. Известно десять изоформ этого белка: GFAP- α , - β , - $\delta(-\epsilon)$, - κ и др. Они имеют определенные отличительные особенности в строении молекул, различаются внутриклеточной локализацией, свойствами сборки, особенностями молекулярных взаимодействий [10]. GFAP- α – наиболее распространенная изоформа ЦНС, состоит из 342 аминокислотных остатков. GFAP- $\delta(-\epsilon)$ – изоформа, характерная для клеток опухолей астроцитарного происхождения и глиоцитов мозга при болезни Альцгеймера [2, 8, 11–13]. Изоформа GFAP- δ свойственна также нейральным стволовым клеткам и радиальной глии [11]. Экспрессия GFAP строго регулируется во время развития мозга и при неврологических заболеваниях.

По данным современной литературы, основными функциями GFAP являются поддержание специфической морфологии астроцитов и стабильности их отростков, участие в их миграции. Следует отметить, что GFAP не только служит важным структурным компонентом цитоскелета астроцитов, но также участвует в транспортировке различных белков к цитоплазматической мембране глиоцитов и их закреплению в ней (например, GLAST и GLT-1 [7, 14]), то есть участвует в процессах клеточной передачи сигналов и модуляции нейрон-глиальных взаимодействий.

В литературе имеется множество доказательств повышения экспрессии GFAP в астроцитах при моделировании различных заболеваний ЦНС. Наблюдаемая активация

синтеза GFAP может играть ключевую роль в развитии астроглиоза [15, 16]. Так, увеличение синтеза GFAP критически важно для формирования утолщенных астроцитарных отростков при реактивном глиозе. Несмотря на разнообразие предполагаемых функций белка, показано, что нокаутные по GFAP мыши развиваются без патологий ЦНС, и реакция астроцитов на повреждение ЦНС практически не изменяется в отсутствие GFAP [16, 17]. Таким образом, роль GFAP в функционировании глиоцитов нервной системы остается неясной.

В связи со значительным увеличением экспрессии GFAP при различных патологических состояниях, включая нейродегенерацию и травмы, этот белок широко используется в качестве маркера активации астроглии [5, 18]. Повышенное содержание GFAP является ранним ответом на нарушение гомеостаза нервной системы и позволяет выявлять наличие повреждения даже при отсутствии явной гибели нейронов [19]. Предполагается, что посттравматическая индукция GFAP и связанный с ней реактивный глиоз могут фактически способствовать нейрогенерации [20]. Однако важно учитывать, что степень активации синтеза GFAP в реактивных астроцитах не во всех случаях пропорциональна тяжести повреждения. Считается, что увеличение содержания GFAP является убедительным признаком реактивного ремоделирования астроцитов, но не является абсолютным маркером реактивности, не коррелирует с ее степенью и не указывает на изменение функций реактивных астроцитов [19]. Показано, что и в нормальном мозге уровни экспрессии GFAP непостоянны и значительно варьируют в различных клетках [21]. Не установлена и связь экспрессии GFAP с изменением клеточной пролиферации [21].

Несмотря на то, что GFAP считается специфичным белком для цитоскелета астроцитов, он встречается и в неглиальных клетках. В частности, в хондроцитах [22] и в клетках Ито в печени [23]. Кроме того, он экспрессируется и в клетках периферической глии. Впервые это было отмечено в конце прошлого века для глиоцитов энтеральной нервной системы (ЭНС) [24, 25]. Дальнейшие исследования показали, что и другие типы глии ПНС могут экспрессировать GFAP. В настоящем обзоре основное внимание уделяется GFAP-содержащим глиальным клеткам ганглиев ЭНС, клеткам-сателлитам спинномозговых узлов (root ganglion, DRG) и шванновским клеткам периферических нервных проводников (табл. 1).

Таблица 1. Глиальные клетки периферической нервной системы

Глиальные клетки	Экспрессия GFAP		Ссылки
	Базальный уровень (в интактных клетках)	Индукцированный уровень (после повреждений)	
Миелинизирующие шванновские клетки	-	+(репаративные SCs)	[26], [27], [28]
Немиелинизирующие шванновские клетки	+	+(репаративные SCs)	[26], [27], [28]
Сателлитная глиа сенсорных ганглиев	+	++ (для определенных видов млекопитающих и при определенных повреждениях)	[29], [30], [31]
Терминальные шванновские клетки в нервно-мышечном соединении		++	[32], [33]
Энтеральная глиа	+	++	[20], [34], [35]
Шванновские клетки кожи	-	-	[36]

GFAP-содержащие клетки энтеральной глии

Клетки ганглиозных сплетений стенки кишки млекопитающих и человека исследуются в течение нескольких десятилетий [37]. Большинство исследований, проведенных в прошлом столетии с применением электронной микроскопии, были посвящены, главным образом, нервным клеткам ганглиев сплетений Ауэрбаха и Мейснера. Меньше внимания уделялось их глиальным элементам. В настоящее время показано, что клетки энтеральной глии (enteric glial cells, EGCs) представляют собой большую популяцию периферической нейроглии, связанной с телами и отростками нейронов ганглиозных сплетений в стенках органов всего желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [38]. По данным последних лет, EGCs играют важную роль в нормальном функционировании кишечника. Они регулируют барьерную функцию эпителия кишечника, через белки-транспортёры модулируют нейротрансмиттеры, участвуют в функциональных реакциях ЖКТ и имеют тесную связь с микробиотой [38].

Некоторые исследователи выделяют четыре подтипа глиоцитов в ЭНС [35, 39], классифицируя их, главным образом, по локализации в стенке ЖКТ. Первый подтип – это астроцитоподобные глиальные клетки, расположенные в ганглиях ауэрбахова сплетения и сходные с астроцитами ЦНС. Вторым подтипом – глиоциты, сопровождающие нервные волокна, третий – глиоциты слизистой оболочки, четвертый – сопровождающие нервные волокна в мышечном слое. Другие исследователи делят энтеральную глию на два подтипа – астроцитоподобные клетки и нейрореммоциты [40, 41]. Некоторые авторы классифицируют EGCs по экспрессии ряда маркеров [42]. Анализ экспрессии маркеров показал, что большинство клеток глии в межмышечном сплетении коэкспрессируют GFAP, S100 β и Sox10. При этом значительная часть (до 80%) глиоцитов за пределами ганглиев не экспрессирует эти белки. Авторы предполагают, что комбинация маркеров отражает динамическую регуляцию генов в клетке и не являются свойством определенного типа глии. Таким образом, с точки зрения фенотипических особенностей отмечается гетерогенность и пластичность EGCs, подчеркивается необходимость дальнейших исследований, направленных на определение их участия в функциях ЖКТ в норме и при патологии [42, 43].

Астроцитоподобные глиальные клетки межмышечного ганглиозного сплетения располагаются вокруг нейронов, плотно прилегая к их телам и отросткам (рис. 1). GFAP⁺ глиоциты имеют отростчатую форму, их отростки проникают между всеми нейронами и располагаются на границе ганглиев с окружающими тканями, формируя структуры, сходные с ножками астроцитов. В связи с такими особенностями морфологии и локализации эти клетки и получили свое название «астроцитоподобные» [35, 40]. Глиальные клетки стенки кишечника отличаются от сателлитов нейронов интрамуральных ганглиев парасимпатической и симпатической нервной системы, а также от клеток-сателлитов сенсорных ганглиев [44]. Это связано с особенностями строения ганглиев ЭНС, которые состоят только из нервных и глиальных клеток. Ганглии окружены базальной мембраной, отделяющей их от окружающих тканей, кровеносные сосуды и элементы рыхлой соединительной ткани располагаются за базальной мембраной [37, 41].

Относительно функций GFAP в EGCs ганглиев межмышечного сплетения кишки имеются только предположения. По аналогии с астроглией ЦНС можно считать, что основными функциями GFAP являются обеспечение специфических структурных особенностей глиоцитов ЭНС и поддержание стабильности их отростков. Глиальные клетки, экспрессирующие GFAP, непосредственно связаны с нейронами и их отростками, простирающимися в подслизистый и мышечный слои кишечника. Предположительно их функции включают в себя нейромодуляцию (например, путем активного поглощения внеклеточных нейротрансмиттеров глиальными клетками), участие в транспорте нейромедиаторов к клеточной поверхности и последующей деградации [20].

При патологии отмечена не только нейромодуляторная роль EGCs, но и иммуномодуляторная [45]. Показано, что двунаправленная связь между EGCs и иммунными клетками способствует иммунному гомеостазу желудочно-кишечного тракта, а перекрестные взаимодействия между EGCs и раковыми стволовыми клетками регулируют опухолеобразование [45].

Следует отметить, что при кишечной патологии отмечается увеличение экспрессии GFAP в EGCs. Так, вестерн-блот-анализ демонстрирует, что уровень экспрессии GFAP повышается в глиоцитах сплетений слизистой оболочки толстой кишки пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [20, 34]. То есть активация экспрессии GFAP кишечной глией может быть реакцией на провоспалительные цитокины, аналогичной реакции астроцитов в ЦНС. Предполагается, что увеличение экспрессии GFAP кишечными глиоцитами может поддерживать целостность тканевых барьеров воспаленного кишечника, вырабатывая защитные факторы [34]. При развитии опухолей также обнаружено усиление экспрессии GFAP [35].

Несмотря на то, что молекулярные механизмы нейроглиальных взаимодействий в ЭНС активно исследуются [40], по-прежнему недостаточно данных, которые бы свидетельствовали об участии GFAP в процессах клеточной передачи сигналов или в механизмах регуляции молекулярных взаимодействий между нейронами и глией.

Современные исследования, выполненные с применением ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга, показали, что GFAP в EGCs встречается в разных изоформах: GFAP-κ [46] и GFAP-j [8]. В отличие от этого типа периферической глии основным транскриптом мРНК GFAP в глии сенсорных ганглиев и нервов считается GFAP-β [9].

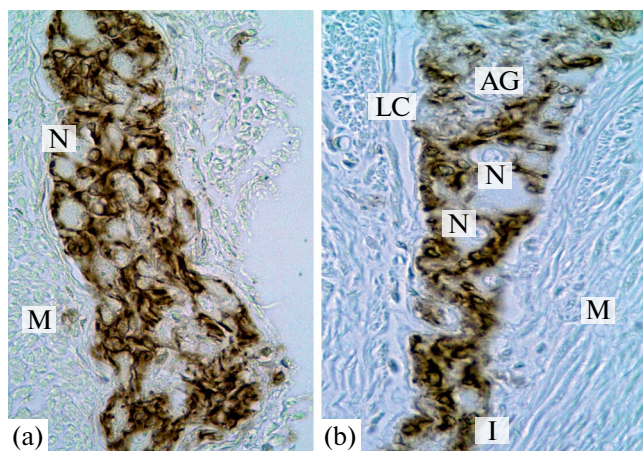


Рис. 1. Астроцитоподобные глиальные клетки в ганглиях межмышечного сплетения. N – нейроны; I – межганглионарный тяж; M – мышцы; LC – лимфатический капилляр; AG – аганглионарный участок. Иммуногистохимическая реакция на GFAP, $\times 400$ (рисунок из статьи Чумасова с соавт., 2023 [41]).

Глиальные клетки спинномозговых узлов и GFAP

Глия спинномозговых узлов имеет ряд фенотипических и морфологических особенностей, которые отличают ее от других типов глиальных клеток. Это связано с особенностью структурой спинномозгового узла (DRG). В состав DRG входят первичные сенсорные нейроны, их отростки, глиальные клетки, фибробласты, отдельные макрофаги, кровеносные сосуды, поверхность ганглия покрыта соединительнотканной капсулой [47]. Сенсорные нейроны имеют округлую или овальную форму, их отростки локали-

зуются в центре узла. Глиальные клетки-сателлиты (satellite glial cells, SGCs) имеют характерную форму полулуния или кольца и располагаются вокруг чувствительного нейрона. В научной литературе порой называют такой нейро-глиальный комплекс «нейро-глиальной единицей» [3, 47], а множество SGCs – «глиальной оболочкой» сенсорного нейрона. Такое уникальное расположение SGCs позволяет им осуществлять строго регулируемый контроль над микроокружением чувствительных нейронов [48].

Описанные особенности локализации SGCs и их морфологии отличают их от других типов глиальных клеток, однако считается, что клетки-сателлиты сенсорных ганглиев имеют много общих свойств с астроцитами [44]. Во-первых, они выполняют сходные с астроцитами функции: контролируют микроокружение нервных клеток и, следовательно, могут модулировать их активность [49, 50]. Во-вторых, они экспрессируют свойственные астроцитам белки – глутаминсинтетазу и различные переносчики нейромедиаторов. В-третьих, показано, что аналогично астроцитам они реагируют на воспаление и повреждение нервов, становясь более реактивными, этот процесс носит название реактивный глиоз [3]. Как и астроциты, SGCs способны участвовать в фагоцитозе, вырабатывать нейрорегуляторные факторы, в условиях *in vitro* используют кальциевую сигнализацию [6]. Кроме того, SGCs могут распространять активацию на другие SGCs посредством увеличения количества щелевых контактов и передачи кальциевых сигналов [48, 51]. Однако механизмы регулирования этих изменений и их влияние на передачу сигналов в сенсорных ганглиях до сих пор остаются неисследованными [51].

При активации глиоцитов происходит продуцирование большего количества GFAP. Следует отметить, что в литературе отсутствует информация о базальных и индуцированных уровнях экспрессии GFAP в клетках-сателлитах чувствительных ганглиев человека, высказываются лишь предположения о его наличии [52]. Установлено, что классический астроцитарный маркер GFAP практически не синтезируется в SGCs у молодых интактных животных. Применение иммуногистохимической реакции на GFAP показало, что у молодых половозрелых крыс число GFAP⁺ клеток DRG невелико [30]. Какова функция этих отдельных GFAP⁺ клеток-сателлитов, неизвестно. По данным наших предыдущих исследований [30], число таких клеток возрастает при изменении состояния внутренней среды (рис. 2). Показано, что в условиях экспериментального системного воспаления [30], при старении [30], при экспериментальном диабете [53], а также после перерезки нерва [31] большая часть SGCs соответствующих сенсорных ганглиев начинает экспрессировать GFAP. Почему отдельные клетки-сателлиты экспрессируют GFAP и в норме, неясно. Можно было бы предположить, что нейроны, окруженные GFAP⁺ SGCs, начинают дегенерировать. Но этому предположению противоречат данные, полученные в экспериментах с травмой нерва. Показано, что нейроны в ганглиях после травмы нерва не подвергаются полной дегенерации, а число GFAP⁺ SGCs при этом возрастает [54]. Отдельные современные исследования демонстрируют, что при травме периферических нервных проводников не происходит потери сенсорных нейронов, что указывает на наличие неизвестных механизмов компенсации нарушений, возникающих при повреждении аксонов [54–56]. Можно предположить, что именно такие репаративные процессы поддерживаются GFAP⁺ SGCs. Таким образом, биохимические особенности SGCs в норме, а также при повреждении органов нервной системы охарактеризованы недостаточно.

Установлено, что при повреждениях ПНС в клетках-сателлитах наблюдаются значительные биохимические перестройки: изменяются их электрические взаимодействия с нейронами, претерпевают изменения процессы функционирования K⁺-каналов глиоцитов, возрастает количество щелевых контактов, объединяющих сателлитные оболочки соседних нейронов [31, 57]. Кроме того, как отмечалось ранее, при патологических процессах наблюдается рост экспрессии GFAP клетками чувствительного ганглия. Несмотря на отсутствие понимания точных механизмов участия GFAP в гли-

альном реактивном ответе, во многих исследованиях данный белок служит молекулярным маркером глиальной активации в DRG. Некоторые исследователи называют белок GFAP маркером патологии, другие – маркером активации [31].

Вопрос о причинах увеличения в сенсорных ганглиях GFAP⁺ клеток после повреждения носит дискуссионный характер. Есть данные о том, что SGCs чувствительных ганглиев в ответ на повреждение соответствующего нерва при воспалительных процессах и других патологиях могут пролиферировать, а затем дифференцироваться не только в глиоциты, но и нейроны [58–60]. Это указывает на возможную связь между изменением экспрессии GFAP сателлитами и увеличением скорости их пролиферации. Однако другими исследователями этот факт не подтверждается: установлено отсутствие глиоза в ганглии после травмы нерва [54, 61], при старении и системном воспалении [30]. Высказывается предположение, что выявленные после повреждения пролиферирующие клетки в DRG являются не глиоцитами, а макрофагами [62].

Точные молекулярные механизмы и функциональное значение увеличения экспрессии GFAP клетками-сателлитами спинномозгового узла при патологии до настоящего момента неизвестны. В исследованиях демонстрируется повышение экспрессии GFAP в SGCs в течение 30 мин – 48 ч после травмы [63], однако механизмы передачи сигнала, ведущего к активации сателлитов, не установлены. Основываясь на исследованиях функций GFAP в астроцитах [64], можно предположить, что белок играет важную роль во взаимодействии глиальных клеток и сенсорных нейронов. Вероятно, увеличение экспрессии GFAP сателлитной глией связано с глутамин-глутаматным взаимодействием между нейронами и глиоцитами. Известно, что клетки-сателлиты поддерживают концентрацию глутамата – основного нейротрансмиттера сенсорных нейронов – на уровне ниже нейротоксического содержания. При различных повреждающих воздействиях избыточное количество медиатора, выделяемого сенсорными нейронами в перинейрональное пространство, утилизируется глиоцитами, экспрессирующими на своей поверхности транспортеры глутамата GLAST и GLT-1 [47]. Возможно, увеличение внеклеточного содержания глутамата, вызванное нарушением гомеостаза нервной системы, приводит к активации синтеза GFAP, необходимого для поддержки функционирования белка-транспортера GLAST и играющего важную роль в процессе прикрепления этого транспортера к плазматической мембране глиоцитов [30].

Несмотря на то, что роль GFAP в клетках ганглия не совсем ясна, данный маркер широко используется для оценки реактивно измененных глиоцитов DRG у грызунов [65, 66]. Важно отметить, что результаты нескольких исследований демонстрируют отсутствие GFAP в клетках-сателлитах у мышей, причем это касается клеток как интактных животных, так и животных с травмой нерва [62, 67, 68]. На основании этих данных можно предположить существование видовых различий в экспрессии широко используемого глиального маркера GFAP. Однако такое заключение не находит подтверждения в результатах исследований, выполненных с использованием других экспериментальных моделей. Так, при системном воспалении в SGCs как у крыс [30], так и у мышей [29] наблюдается увеличение иммунореактивности к GFAP. При использовании модели нейропатической боли или индуцированной диабетической нейропатии [53] как у мышей, так и у крыс наблюдается увеличение количества GFAP⁺ клеток-сателлитов. По-видимому, изменения в экспрессии GFAP являются не следствием реактивного ответа глиоцитов на патологические стимулы, а отражают физиологическую адаптивную пластичность клеток. Можно предположить, что различие в результатах исследований вызвано процессами альтернативного сплайсинга и невозможностью определения различных изоформ белка.

Особый интерес представляют данные, согласно которым при нарушении гомеостаза нервной системы в DRG могут присутствовать не только экспрессирующие GFAP клетки-сателлиты, но и другие типы глиоцитов, начинающие синтезировать данный белок после повреждения. Это могут быть как репаративные шванновские клетки, так

и иная субпопуляция глиоцитов [31]. Таким образом, использование GFAP в качестве универсального маркера реактивности SGCs не вполне оправдано. Необходимы дальнейшие исследования для оценки функционального значения данного белка в различных типах глиоцитов чувствительного ганглия. Все изложенные факты не позволяют сделать однозначного заключения о функциях GFAP в глии DRG.

Доказано, что SGCs спинномозгового узла имеют общего предшественника со шванновскими клетками (SCs) [48]. Они экспрессируют ряд маркеров, предшественников SCs, в частности, кадгерин-19 (CDH19) даже у взрослых животных. Показано, что SGCs транскрипционно и морфологически сходны со SCs, в условиях *in vitro* они даже способны миелинизировать аксоны при совместном культивировании с нейрональными клетками. Следует отметить, что SCs в определенных условиях также способны экспрессировать GFAP. Этому вопросу посвящен следующий раздел обзора.

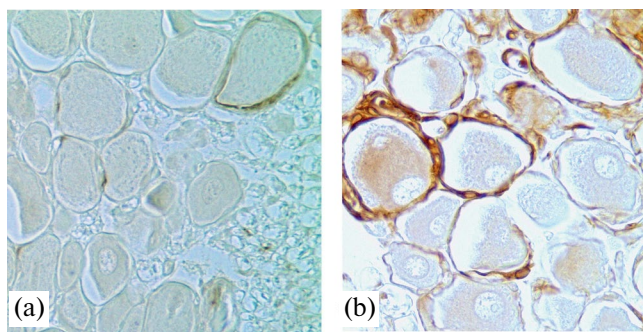


Рис. 2. Увеличение GFAP-иммунопозитивных клеток-сателлитов в DRG при старении. (a) – трехмесячная крыса; (b) – крыса в возрасте 18 месяцев. Иммуногистохимическая реакция на GFAP, $\times 400$. Собственные данные.

ОСОБЕННОСТИ ШВАННОВСКИХ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ GFAP

Еще одна популяция глиальных клеток ПНС, рассматриваемых в данном обзоре, – шванновские клетки (SCs). SCs в онтогенезе происходят из клеток нервного гребня, регулируют структурные и функциональные свойства нейронов ПНС, вырабатывают ростовые факторы и цитокины, образуют миелиновые оболочки аксонов, участвуют в реакции на повреждение ПНС путем фагоцитирования фрагментов аксона и миелиновой оболочки, подвергаются быстрой пролиферации, обеспечивая регенерацию аксонов [37, 69].

Исследования показали, что GFAP начинает экспрессироваться в незрелых SCs на поздних сроках эмбриогенеза, и его синтез подавляется во взрослых миелинизирующих шванновских клетках, оставаясь при этом в немиелинизирующих и репаративных SCs [26]. Немиелинизирующие шванновские клетки являются одним из основных типов периферической глии. Они сопровождают практически все безмиелиновые нервные волокна. Они имеют одно происхождение с глией DRG, формируются из клеток нервного гребня [70]. Их отличительной особенностью является тот факт, что для их развития необходим фактор роста нейрегулин. Их морфология также отличается от других клеток глии ПНС: они имеют вытянутую форму, располагаются вблизи аксонов и тесно связаны с ними. В отличие от миелинизирующих SCs они образуют связи не с одним, а с несколькими аксонами [71].

После повреждения нервного ствола SCs в его дистальном сегменте достаточно быстро претерпевают значительные фенотипические изменения, в частности, начинают

синтезировать GFAP (рис. 3) [27, 28, 72, 73]. Такие SCs нового фенотипа, специализирующиеся на восстановлении нерва, принято называть «репаративные SCs» («repair Schwann cell»). Репаративные SCs выполняют ряд важных функций, вырабатывая ростовые факторы и цитокины, а также формируя бунгнеровские ленты, по которым осуществляется рост новых регенерирующих аксонов из проксимального в дистальный конец. Во время регенерации периферических нервов у мышей, лишенных GFAP, наблюдается замедление роста аксонов и нарушение пролиферации SCs, а также снижение способности этих клеток направлять и поддерживать регенерирующие аксоны. Полное функциональное восстановление нерва при этом достигается, однако с незначительной задержкой [74, 75].

Известно, что в отличие от SCs миелиновых волокон, репаративные SCs, как и SCs немиелиновых волокон, вступают во взаимодействие не с одним нервным волокном, а с несколькими, которые располагаются в цитоплазматических впадинах SCs. Функция GFAP в репаративных SCs связана, очевидно, с их структурными особенностями. Они отличаются большой протяженностью и превосходят по длине SCs и миелиновых, и безмиелиновых волокон [72]. Здесь проявляется роль GFAP как структурного белка. Очевидна необходимость в синтезе большого количества GFAP для поддержания структурной целостности такой клетки.

Исследования, проведенные на нокаутных мышах, показали, что развитие ПНС в отсутствие GFAP происходит без изменений, и периферические нервные проводники проявляют сходные свойства регенерации по сравнению с контрольной группой дикого типа [75]. Предполагается, что отсутствие GFAP ведет к незначительной задержке регенерации нервов после повреждения из-за изменения процессов пролиферации SCs [74]. Вопрос участия GFAP SCs в транспортировке различных белков к цитоплазматической мембране, аналогично астроцитам и SGCs, еще предстоит изучить.

Кроме миелинизирующих, немиелинизирующих и репаративных SCs выделяют терминальные (перисинаптические) SCs, связанные с нервными окончаниями в нервно-мышечном соединении. Такие глиоциты окружают синапс, тесно контактируя с его пре- и постсинаптическими компонентами [76]. Терминальные SCs представляют собой немиелинизирующие SCs, происходящие из клеток нервного гребня, которые мигрируют вместе с растущим аксоном. Они помогают поддерживать целостность синаптического соединения, имеют рецепторы нейротрансмиттеров, выделяют нейроактивные вещества [77]. В период формирования нервной системы и по мере ее созревания терминальные SCs играют значимую роль в процессах элиминации и ремоделирования синапсов, а также регуляции синаптической активности [78]. При регенерации терминальные SCs формируют большое количество отростков, направляют растущие аксоны и способствуют реиннервации мышц [79].

Вопрос об экспрессии GFAP терминальными SCs дискуссионен. Показано, что перисимпатические SCs в скелетных мышцах экспрессируют маркер астроцитов и немиелинизирующих SCs GFAP, а также маркер миелинизирующих SCs – белок S100 β [80]. Есть данные о том, что экспрессия GFAP наблюдается в терминальных SCs в норме [80, 81] и увеличивается при патологии [33]. Другие авторы в работе, посвященной исследованию иммуногистохимических маркеров клеток тимуса, высказывают мнение о том, что терминальные SCs не содержат GFAP в условиях контакта с интактным аксоном (то есть в норме), а начинают экспрессировать его после повреждения [82]. Учитывая противоположные мнения по данному вопросу, нельзя исключать, что в зависимости от микроокружения (от иннервируемых тканей) терминальные SCs имеют разные фенотипические особенности и, возможно, представляют собой разные популяции.

В некоторых работах отмечена связь между ацетилхолином и GFAP терминальных SCs. Установлено, что терминальные глиоциты экспрессируют мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR), и их активация необходима для поддержания низкой экспрессии GFAP [32, 33]. Считается, что высвобождение ацетилхолина из нервных

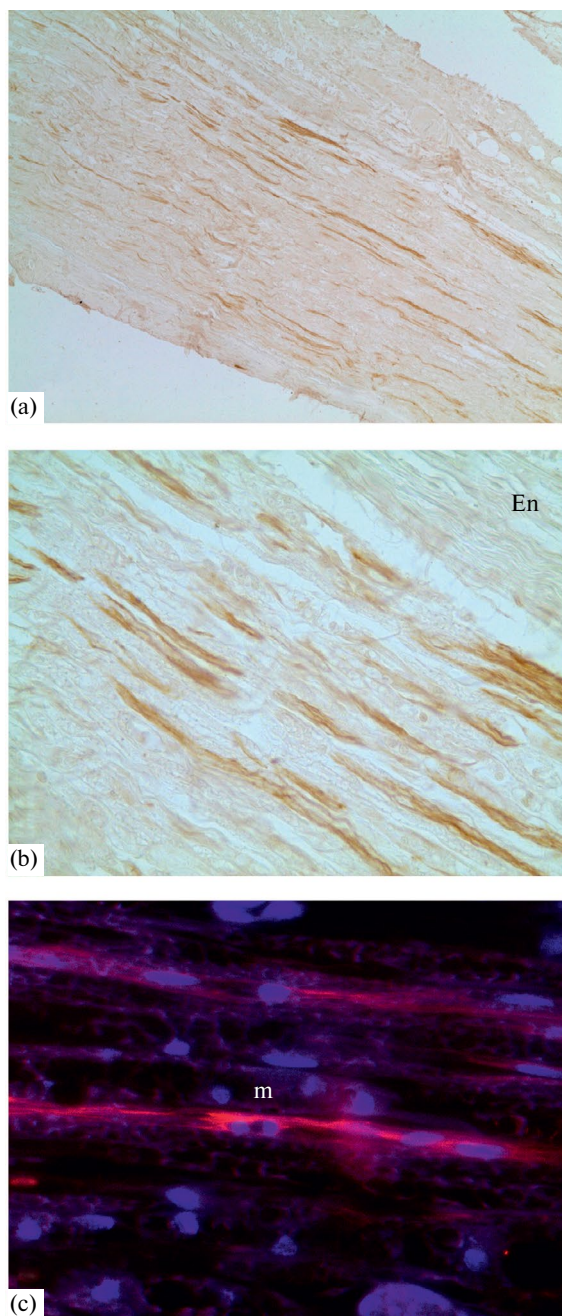


Рис. 3. Шванновские клетки (repair Schwann cells) в дистальном сегменте поврежденного нерва крысы через 7 суток после операции (лигатура, 40 с). (а) – общий вид дистального сегмента нерва, продольный срез, (б) – фрагмент эндоневрия со шванновскими клетками, (с) – митотически делящаяся (m) шванновская клетка. En – эндоневрий седалищного нерва крысы. Иммуногистохимическая реакция на GFAP. Визуализация с помощью флуорохрома TRITC (красный), подкрашивание ядер DAPI (синий), $\times 100$ (а), $\times 400$ (б), $\times 600$ (с) (рисунок из статьи Петровой Е.С., Колос Е.А. [73]).

окончаний является сигналом, поддерживающим низкий уровень GFAP в перисинаптических SCs [33]. Другие нейротрансмиттеры не влияют на изменение его экспрессии.

Помимо перечисленных популяций SCs, к глии ПНС относятся также SCs кожи. Они являются производными клеток пограничной шапочки (boundary cap cells) корешков спинного мозга и входят в состав сенсорных телец кожи. Клетки пограничной шапочки, локализующиеся в зоне входа корешков эмбрионального спинного мозга на границе ЦНС и ПНС, представляют собой субпопуляцию мультипотентных клеток, происходящих из клеток нервного гребня [83]. Считается, что SCs кожи представляют собой основную популяцию стволовых клеток дермы [84]. В литературе представлено мало информации об экспрессии этими клетками GFAP. Единичные исследования демонстрируют отсутствие иммунореактивности к GFAP в сенсорных тельцах кожи человека [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящий обзор посвящен обобщению данных об экспрессии белка промежуточных филаментов GFAP глиоцитами ЦНС и ПНС. Несмотря на то, что глия ЦНС и ПНС имеет разное происхождение (астроциты являются производными нервной трубки, а EGCs, SGCs и SCs – производными клеток нервного гребня), некоторые фенотипические особенности этих клеток могут быть сходны, поскольку основное назначение перечисленных клеточных популяций одинаково – обеспечение условий для нормального функционирования нейронов. В настоящей работе рассматривается экспрессия глиоцитами белка промежуточных филаментов GFAP, который является селективным иммуногистохимическим маркером астроцитов и в той или иной степени синтезируется глией ПНС. Отличие настоящего обзора от других обобщений, посвященных GFAP, в том, что изложенные данные позволяют провести сравнение не только глиоцитов ПНС с астроцитами мозга, но и различных популяций периферической глии (EGCs, SGCs и SCs) между собой на предмет возможности экспрессии ими этого важного структурно-функционального белка. Известно, что GFAP способствует реализации таких функций астроцитарной глии, как структурная, метаболическая, защитная, барьерная и др. Можно заключить, что в ПНС GFAP участвует в поддержании структурной стабильности глиальных клеток аналогично его роли в ЦНС. Так, SCs после повреждения нервных проводников дедифференцируются, образуя новую фенотипическую популяцию SCs, высокий уровень экспрессии GFAP в этих клетках связан с их структурными особенностями, формированием бунгнеровских лент, необходимостью поддерживать регенерирующие аксоны. GFAP также необходим клеткам-сателлитам спинальных ганглиев для поддержки чувствительных нейронов при патологии. Нередко GFAP используют в качестве иммуногистохимического маркера для EGCs, SGCs и SCs. В одних случаях (для SGCs и EGCs) он рассматривается как маркер патологии, в других случаях (для SCs) – как маркер регенерации. Несмотря на то, что порой корреляция между уровнем GFAP и тяжестью повреждений отсутствует, увеличение экспрессии GFAP в глиальных клетках ПНС может служить ранним индикатором патологических процессов, выступать маркером реактивного глиоза. Показано, что GFAP участвует в различных физиологических и патологических процессах в ПНС, однако точные механизмы его действия остаются неясными. Описанные особенности GFAP⁺ глиоцитов разных отделов ПНС демонстрируют функциональный полиморфизм этого белка. Его свойство экспрессироваться в периферической глии в ответ на повреждение нуждается в дальнейших исследованиях. Недостаточно данных, которые бы свидетельствовали об участии GFAP в процессах клеточной передачи сигналов или в механизмах регуляции молекулярных взаимодействий между нейронами и глией. Дальнейшие исследования необходимы для лучшего понимания роли GFAP в регуляции нейрон-глиальных взаимодействий и разработке терапевтических стратегий для лечения нейропатий и боли.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Разработка концепции, анализ данных, написание и редактирование манускрипта (Е. С. П., Е. А. К.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sofroniew MV, Vinters HV* (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119(1): 7–35.
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
2. *Sukhorukova EG, Korzhhevskii DE, Alekseeva OS* (2015) Glial fibrillary acidic protein: The component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes. *J Evol Biochem Phys* 51: 1–10.
<https://doi.org/10.1134/S0022093015010019>
3. *McGinnis A, Ji R-R* (2023) The Similar and Distinct Roles of Satellite Glial Cells and Spinal Astrocytes in Neuropathic Pain. *Cells* 12(6): 965.
<https://doi.org/10.3390/cells12060965>
4. *Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS* (1996) GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17(4): 607–615.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80194-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80194-4)
5. *Hol EM, Pekny M* (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32: 121–130.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
6. *Hanani M, Verkhatsky A* (2021) Satellite Glial Cells and Astrocytes, a Comparative Review. *Neurochem Res* 46(10): 2525–2537.
<https://doi.org/10.1007/s11064-021-03255-8>
7. *Middeldorp J, Hol EM* (2011) GFAP in health and disease *Prog Neurobiol* 93(3): 421–443.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
8. *Sullivan SM* (2014) GFAP variants in health and disease: stars of the brain... and gut. *J Neurochem* 130(6): 729–732.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12754>
9. *Messing A, Brenner M* (2020) GFAP at 50. *ASN Neuro* 12: 1759091420949680.
<https://doi.org/10.1177/1759091420949680>
10. *De Reus AJEM, Basak O, Dykstra W, van Asperen JV, van Bodegraven EJ, Hol EM* (2024) GFAP-isoforms in the nervous system: Understanding the need for diversity. *Curr Opin Cell Biol* 87: 102340.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102340>
11. *Mamber C, Kamphuis W, Haring NL, Peprah N, Middeldorp J, Hol EM* (2012) GFAP δ expression in glia of the developmental and adolescent mouse brain. *PLoS One* 7(12): e52659.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052659>
12. *Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, Kooijman L, Sluijs JA, Jansen AH, Verveer M, de Groot LR, Smith VD, Rangarajan S, Rodriguez JJ, Orre M, Hol EM* (2012) GFAP Isoforms in Adult Mouse Brain with a Focus on Neurogenic Astrocytes and Reactive Astrogliosis in Mouse Models of Alzheimer Disease. *PLoS ONE* 7(8): e42823.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042823>

13. Moeton M, Stassen OM, Sluijs JA, van der Meer VW, Kluivers LJ, van Hoorn H, Schmidt T, Reits EA, van Strien ME, Hol EM (2016) GFAP isoforms control intermediate filament network dynamics, cell morphology, and focal adhesions. *Cell Mol Life Sci* 73(21): 4101–4120. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2239-5>
14. Sullivan SM, Lee A, Bjorkman ST, Miller SM, Sullivan RK, Poronnik P, Colditz PB, Pow DV (2007) Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP. *J Biol Chem* 282: 29414–29423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704152200>
15. Eng LF, Ghirnikar RS (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4(3): 229–237. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x>
16. Brenner M (2014) Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett* 565: 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.055>
17. Wang X, Messing A, David S (1997) Axonal and Nonneuronal Cell Responses to Spinal Cord Injury in Mice Lacking Glial Fibrillary Acidic Protein. *Exp Neurol* 148: 568–576. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6702>
18. Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, Kuter KZ (2021) Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules* 11: 1361. <https://doi.org/10.3390/biom11091361>
19. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, Steinhäuser C, Volterra A, Carmignoto G, Agarwal A, Allen NJ, Araque A, Barbeito L, Barzilai A, Bergles DE, Bonvento G, Butt AM, Chen WT, Cohen-Salmon M, Cunningham C, Deneen B, De Strooper B, Díaz-Castro B, Farina C, Freeman M, Gallo V, Goldman JE, Goldman SA, Götz M, Gutiérrez A, Haydon PG, Heiland DH, Hol EM, Holt MG, Iino M, Kastanenka KV, Kettenmann H, Khakh BS, Koizumi S, Lee CJ, Liddelow SA, MacVicar BA, Magistretti P, Messing A, Mishra A, Molofsky AV, Murai KK, Norris CM, Okada S, Oliet SHR, Oliveira JF, Panatier A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Pellerin L, Perea G, Pérez-Nievas BG, Pfrieder FW, Poskanzer KE, Quintana FJ, Ransohoff RM, Riquelme-Perez M, Robel S, Rose CR, Rothstein JD, Rouach N, Rowitch DH, Semyanov A, Sirko S, Sontheimer H, Swanson RA, Vitorica J, Wanner IB, Wood LB, Wu J, Zheng B, Zimmer ER, Zorec R, Sofroniew MV, Verkhratsky A (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 24(3): 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
20. Yang Z, Wang KK (2015) Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci* 38(6): 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
21. Lawrence JM, Schardien K, Wigdahl B, Nonnemacher MR (2023) Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. *Acta Neuropathol Commun* 11: 42. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01526-9>
22. Kanazawa S, Nishizawa S, Takato T, Hoshi K (2017) Biological roles of glial fibrillary acidic protein as a biomarker in cartilage regenerative medicine. *J Cell Physiol* 232(11): 3182–3193. <https://doi.org/10.1002/jcp.25771>
23. Shang L, Hosseini M, Liu X, Kisseleva T, Brenner DA (2018) Human hepatic stellate cell isolation and characterization. *J Gastroenterol* 53(1): 6–17. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1404-4>
24. Jessen KR, Mirsky R (1983) Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J Neurosci* 3: 2206–2218.
25. Kato H, Yamamoto T, Yamamoto H, Ohi R, So N, Iwasaki Y (1990) Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 25(5): 514–519. [https://doi.org/10.1016/0022-3468\(90\)90563-o](https://doi.org/10.1016/0022-3468(90)90563-o)
26. Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R (1990) Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109(1): 91–103. <https://doi.org/10.1242/dev.109.1.91>
27. Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC (2015) Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(7): a020487. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>
28. Jessen KR, Arthur-Farraj P (2019) Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *Glia* 67(3): 437. <https://doi.org/10.1002/glia.23532>
29. Mohr KM, Pallesen LT, Richner M, Vaegter CB (2021) Discrepancy in the Usage of GFAP as a Marker of Satellite Glial Cell Reactivity. *Biomedicines* 9(8): 1022. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081022>

30. *Kolos EA, Korzhevskii DE* (2020) Immunohistological Detection of Active Satellite Cells in Rat Dorsal Root Ganglia after Parenteral Administration of Lipopolysaccharide and during Aging. *Bull Exp Biol Med* 169(5): 665–668.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04950-2>
31. *Konnova EA, Deftu AF, Chu Sin Chung P, Pertin M, Kirschmann G, Decosterd I, Suter MR* (2023) Characterisation of GFAP-Expressing Glial Cells in the Dorsal Root Ganglion after Spared Nerve Injury. *Int J Mol Sci* 24(21): 15559.
<https://doi.org/10.3390/ijms242115559>
32. *Georgiou J, Robitaille R, Trimble WS, Charlton MP* (1994). Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron* 12(2): 443–455.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90284-4)
33. *Georgiou J, Robitaille R, Charlton MP* (1999) Muscarinic control of cytoskeleton in perisynaptic glia. *J Neurosci* 19(10): 3836–3846.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-10-03836.1999>
34. *Von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J* (2004) Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53(2): 222–228.
<https://doi.org/10.1136/gut.2003.012625>
35. *Grundmann D, Loris E, Maas-Omlor S, Huang W, Scheller A, Kirchhoff F, Schäfer KH* (2019) Enteric glia: S100, GFAP, and beyond. *Anat Rec (Hoboken)* 302(8): 1333–1344.
<https://doi.org/10.1002/ar.24128>
36. *Cobo R, García-Piqueras J, Cobo J, Vega JA* (2021) The Human Cutaneous Sensory Corpuscles: An Update. *J Clin Med* 10(2): 227.
<https://doi.org/10.3390/jcm10020227>
37. *Ноздрачев АД, Чумасов ЕИ* (1999) Периферическая нервная система. СПб. Наука. [*Nozdrachev AD, Chumasov EI* (1999) Peripheral nervous system. Sankt-Peterburg. Nauka. (In Russ)].
38. *Lu T, Huang C, Weng R, Wang Z, Sun H, Ma X* (2024) Enteric glial cells contribute to chronic stress-induced alterations in the intestinal microbiota and barrier in rats. *Heliyon* 10(3): e24899.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24899>
39. *Gulbransen BD, Sharkey KA* (2012) Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 625–632.
40. *Pawolowski V, Schmidt MH* (2021) Neuron–glia interaction in the developing and adult enteric nervous system. *Cells* 10: 47.
<https://doi.org/10.3390/cells10010047>
41. *Чумасов ЕИ, Майстренко НА, Ромащенко ПН, Самедов ВВ, Петрова ЕС, Коржевский ДЭ* (2023) Патологические изменения глиальных клеток в энтеральной нервной системе толстой кишки при хроническом медленно-транзитном запоре. *Сибирск науч мед журн* 43(6): 191–202. [*Chumasov EI, Majstrenko NA, Romashhenko PN, Samedov VB, Petrova ES, Korzhevskij DE* (2023) 'Pathological changes in glial cells in the enteric nervous system of the colon during chronic slow-transit constipation. *Sibirsk nauch med zhurn* 43(6): 191–202. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18699/SSMJ20230624>
42. *Boesmans W, Lasrado R, Vanden Berghe P, Pachnis V* (2015) Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* 63(2): 229–241.
<https://doi.org/10.1002/glia.22746>
43. *Lasrado R, Boesmans W, Kleinjung J, Pin C, Bell D, Bhaw L, McCallum S, Zong H, Luo L, Clevvers H, Vanden Berghe P, Pachnis V* (2017) Lineage-dependent spatial and functional organization of the mammalian enteric nervous system. *Science* 356(6339): 722–726.
<https://doi.org/10.1126/science.aam7511>
44. *Hanani M* (2010) Satellite glial cells: more than just 'rings around the neuron'. *Neuron Glia Biol* 6(1): 1–2.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X10000104>
45. *Seguella L, Gulbransen BD* (2021) Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18(8): 571–587.
<https://doi.org/10.1038/s41575-021-00423-7>
46. *Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, Rolli-Derkinderen M, Coron E, Neunlist M, Hol EM, Derkinderen P* (2014) Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 130(6): 805–815.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12742>
47. *Pannese E* (2018) Biology and Pathology of Perineuronal Satellite Cells in Sensory Ganglia. Springer. Berlin/Heidelberg. Germany.
48. *George D, Ahrens P, Lambert S* (2018) Satellite glial cells represent a population of developmentally arrested Schwann cells. *Glia* 66(7): 1496–1506.
<https://doi.org/10.1002/glia.23320>

49. Huang LY, Gu Y, Chen Y (2013) Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia* 61(10): 1571–1581.
<https://doi.org/10.1002/glia.22541>
50. Costa FA, Moreira Neto FL (2015) Células gliais satélites de gânglios sensitivos: o seu papel na dor [Satellite glial cells in sensory ganglia: its role in pain]. *Rev Bras Anestesiol* 65(1): 73–81.
<https://doi.org/10.1016/j.bjan.2013.07.013>
51. Izmiryan A, Li Z, Nothias F, Eyer J, Paulin D, Soares S, Xue Z (2021). Inactivation of vimentin in satellite glial cells affects dorsal root ganglion intermediate filament expression and neuronal axon growth in vitro. *Mol Cell Neurosci* 115: 103659.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103659>
52. Li Y, North RY, Rhines LD, Tatsui CE, Rao G, Edwards DD, Cassidy RM, Harrison DS, Johansson CA, Zhang H, Dougherty PM (2018) DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain. *J Neurosci* 38: 1124–1136.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0899–17.2017>
53. Hanani M, Blum E, Liu S, Peng L, Liang S (2014) Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in streptozotocin-treated rodents. *J Cell Mol Med* 18(12): 2367–2371.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12406>
54. Schulte A, Lohner H, Degenbeck J, Segebarth D, Rittner HL, Blum R, Aue A (2023) Unbiased analysis of the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury: no neuronal loss, no gliosis, but satellite glial cell plasticity. *Pain* 164(4): 728–740.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002758>
55. Renthall W, Tochitsky I, Yang L, Cheng YC, Li E., Kawaguchi R, Geschwind DH, Woolf CJ (2020) Transcriptional Reprogramming of Distinct Peripheral Sensory Neuron Subtypes after Axonal Injury. *Neuron* 108(1): 128–144.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.026>
56. Krishnan A, Areti A, Komirishetty P, Chandrasekhar A, Cheng C, Zochodne DW (2022) Survival of compromised adult sensory neurons involves macrovesicular formation. *Cell Death Discov* 8: 462.
<https://doi.org/10.1038/s41420–022–01247–3>
57. Hanani M, Spray DC (2013) Glial Cells in Autonomic and Sensory Ganglia. In: Kettenmann H RB (Eds) *Neuroglia*. Oxford Univer Press. 122–133.
58. Nascimento DS, Castro-Lopes JM, Moreira Neto FL (2014) Satellite glial cells surrounding primary afferent neurons are activated and proliferate during monoarthritis in rats: is there a role for ATF3? *PLoS One* 9(9): e108152
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108152>
59. Zhang L, Xie R, Yang J, Zhao Y, Qi C, Bian G, Wang M, Shan J, Wang C, Wang D, Luo C, Wang Y, Wu S (2019) Chronic pain induces nociceptive neurogenesis in dorsal root ganglia from Sox2-positive satellite cells. *Glia* 67(6): 1062–1075.
<https://doi.org/10.1002/glia.23588>
60. Huang B, Zdora I, de Buhr N, Lehmbecker A, Baumgärtner W, Leitzen E (2021) Phenotypical peculiarities and species-specific differences of canine and murine satellite glial cells of spinal ganglia. *J Cell Mol Med* 25(14): 6909–6924.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.16701>
61. Avraham O, Deng PY, Jones S, Kuruvilla R, Semenkovich CF, Klyachko VA, Cavalli V (2020) Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. *Nat Commun* 11(1): 4891.
<https://doi.org/10.1038/s41467–020–18642-y>
62. Jager SE, Pallesen LT, Richner M, Harley P, Hore Z, McMahon S, Denk F, Vaegter CB (2020) Changes in the transcriptional fingerprint of satellite glial cells following peripheral nerve injury. *Glia* 68(7): 1375–1395.
<https://doi.org/10.1002/glia.23785>
63. Hanani M (2022) How Is Peripheral Injury Signaled to Satellite Glial Cells in Sensory Ganglia? *Cells* 11(3): 512.
<https://doi.org/10.3390/cells11030512>
64. Steward O, Torre ER, Tomasulo R, Lothman E (1991) Neuronal activity up-regulates astroglial gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15): 6819–6823.
65. Christie K, Koshy D, Cheng C, Guo G, Martinez JA, Duraikannu A, Zochodne DW (2015) Intraganglionic interactions between satellite cells and adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 67:1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.05.001>
66. Wang F, Xiang H, Fischer G, Liu Z, Dupont MJ, Hogan QH, Yu HH (2016) MG-CoA synthase isoenzymes 1 and 2 localize to satellite glial cells in dorsal root ganglia and are differentially regulated by peripheral nerve injury. *Brain Res* 1652: 62–70.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.032>

67. Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, Johnsson A, Memic F, van der Zwan J, Häring M, Braun E, Borm LE, La Manno G, Codeluppi S, Furlan A, Lee K, Skene N, Harris KD, Hjerling-Leffler J, Arenas E, Ernfrors P, Marklund U, Linnarsson S (2018) Molecular architecture of the mouse nervous system. *Cell* 174(4): 999–1014.e22.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>
68. Carlin D, Halevi AE, Ewan EE, Moore AM, Cavalli V (2019) Nociceptor deletion of Tsc2 enhances axon regeneration by inducing a conditioning injury response in dorsal root ganglia. *eNeuro* 6(3): ENEURO.0168–19.2019.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0168–19.2019>
69. Petrova ES (2019) Current views on Schwann cells: development, plasticity, functions. *J Evol Biochem Physiol* 55(6): 433–447.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019060012>
70. Pannese E (1994) *Neurocytology: Fine Structure of Neurons, Nerve Processes, and Neuroglial Cells*. G. Thieme Verlag, Stuttgart. Thieme Med Publ. New York.
71. Campana WM (2007) Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun* 21(5): 522–527.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.12.008>
72. Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, Fazal SV, Benito C, Wagstaff LJ, Mirsky R, Jensen KR (2017) After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *J Neurosci* 37(37): 9086–9099.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1453–17.2017>
73. Петрова ЕС, Колос ЕА (2023) Морфологическое исследование процессов валлеровской дегенерации в седалищном нерве крысы после механического повреждения. *Клин экспер морфол* 12(4): 62–70. [Petrova ES, Kolos EA (2023) Morphological study of Wallerian processes degeneration in the rat sciatic nerve after mechanical injury. *Klin eksp morfol* 12(4): 62–70. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31088/cem2023.12.4.62–70>
74. Triolo D, Dina G, Lorenzetti I, Malaguti M, Morana P, Del Carro U, Comi G, Messing A, Quattrini A, Previtali SC (2006) Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J Cell Sci* 119(Pt 19): 3981–3993.
<https://doi.org/10.1242/jcs.03168>
75. Berg A, Zelano J, Pekna M, Wilhelmsson U, Pekny M, Cullheim S (2013) Axonal regeneration after sciatic nerve lesion is delayed but complete in GFAP- and vimentin-deficient mice. *PLoS One* 8(11): e79395.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079395>
76. Ko CP, Robitaille R (2015) Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(10): a020503.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020503>
77. Fields RD (2009) Schwann Cells and Axon Relationship. In: Larry R Squire (Ed) *Encyclopedia of Neuroscience*. Acad Press. 485–489.
<https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00698-7>
78. Reed CB, Feltri ML, Wilson ER (2022) Peripheral glia diversity. *J Anat* 241(5): 1219–1234.
<https://doi.org/10.1111/joa.13484>
79. Hastings RL, Mikesk M, Lee YI, Thompson WJ (2020) Morphological remodeling during recovery of the neuromuscular junction from terminal Schwann cell ablation in adult mice. *Sci Rep* 10(1): 11132.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67630-1>
80. Powell JA, Molgó J, Adams DS, Colasante C, Williams A, Bohlen M, Jaimovich E (2003) IP3 receptors and associated Ca²⁺ signals localize to satellite cells and to components of the neuromuscular junction in skeletal muscle. *J Neurosci* 10(23): 8185–8192.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23–23-08185.2003>
81. Liu JX, Brännström T, Andersen PM, Pedrosa-Domellöf F (2013) Distinct changes in synaptic protein composition at neuromuscular junctions of extraocular muscles versus limb muscles of ALS donors. *PLoS One* 8(2): e57473.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057473>
82. Günther HS, Henne S, Oehlmann J, Urban J, Pleizier D, Renevier N, Lohr C, Wülfing C (2021) GFAP and desmin expression in lymphatic tissues leads to difficulties in distinguishing between glial and stromal cells. *Sci Rep* 11(1): 13322.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92364-z>
83. Kolos EA, Korzhevskii DE (2021) Glutamine Synthetase in the Cells of the Developing Rat Spinal Cord. *Russ J Dev Biol* 52: 334–343.
<https://doi.org/10.1134/S1062360421050040>
84. Radomska KJ, Topilko P (2017) Boundary cap cells in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 47: 209–215.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.11.003>

Astrocyte Marker GFAP in Gliocytes of the Peripheral Nervous System**E. S. Petrova^a, and E. A. Kolos^a***^aInstitute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

The study of peripheral nervous system glial cells is an actual problem of modern neurobiology. The purpose of this work was to summarize our own and published data on the distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in peripheral nervous system (PNS) glial cells. The features of GFAP expression in glial cells of the enteric nervous system, dorsal root ganglion and peripheral nerve were examined. A comparative study of different populations of PNS gliocytes led to the conclusion that the intermediate filament protein GFAP is distributed differently in them. Analysis of the literature showed that despite the fact that this protein is widely used as a molecular marker of glial activation, there is still no understanding of the exact mechanisms of GFAP participation in the glial reactive response. The described features of GFAP+gliocytes from different parts of the PNS demonstrate the functional polymorphism of this protein. Its ability to be expressed in peripheral nervous system gliocytes in response to injury requires further research.

Keywords: glial fibrillary acidic protein, peripheral nervous system, dorsal root ganglion, nerve, ganglionic plexuses of the colon wall, regeneration, immunohistochemistry

ОБЗОРЫ

РОЛЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ФУНКЦИОНАЛЬНОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОСЛЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

© 2024 г. С. П. Коновалова¹, Ю. И. Сысоев^{1,2,3}, А. Ветлугина¹, К. А. Арсентьев¹,
П. Е. Мусиенко^{1,4,5,*}

¹Направление “Нейробиология”, Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет “Сириус”, Федеральная территория Сириус, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴Life Improvement by Future Technologies Center “LIFT”, Москва, Россия

⁵Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

*E-mail: musienko.pe@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 18.08.2024 г.

Принята к публикации 19.08.2024 г.

Серотонинергическая система играет важную роль в модуляции активности спинномозговых сетей, участвующих в контроле двигательных, сенсорных и висцеральных функций. Повреждение проводящих путей при травме спинного мозга (ТСМ) может вызвать состояние чрезмерного возбуждения, что способствует развитию боли, спастичности и дисрегуляции вегетативных функций. При этом известно, что аксоны серотонинергических нейронов быстрее других адаптируются к патофизиологическим изменениям и оставляют способность к прорастанию и регенерации даже после травмы. Ряд экспериментальных исследований на животных, а также некоторые клинические наблюдения дают основания полагать, что серотонинергическая система является ключевым эндогенным ресурсом посттравматического восстановления. Специфическая терапия может включать использование серотонинергических препаратов и интраспинальную трансплантацию серотонинергических нейронов. Настоящий обзор посвящен обсуждению роли серотонинергической системы в функциональном восстановлении после ТСМ и перспективам использования серотонинергических препаратов при нейрореабилитации.

Ключевые слова: травма спинного мозга, серотонин, нейрорегенерация, функциональное восстановление, двигательные нарушения, висцеральная дисфункция, нейрогенез, ТРН2-КО

DOI: 10.31857/S0869813924090027, **EDN:** AKGKFA

ВВЕДЕНИЕ

Травма спинного мозга (ТСМ) является важной медико-социальной проблемой и одной из главных причин инвалидизации, о которой ежегодно сообщается от 250 000 до 500 000 случаев во всем мире, при этом возрастная группа с самым высоким риском возникновения травмы приходится на молодой трудоспособный возраст от 15

до 25 лет [1]. ТСМ возникают в результате удара или разрыва тканей, которые приводят к нарушениям двигательной, сенсорной и вегетативной функций спинного мозга [2]. Известно, что первоначальная механическая травма инициирует каскад вторичных повреждений, который приводит к прогрессирующей гибели клеток и последующему повреждению спинного мозга в течение длительного периода [3]. Со временем данное поражение remodelируется, образуются кистозные полости и формируется глиальный рубец [4]. Это сильно ограничивает регенерацию тканей в месте повреждения, приводя к возникновению двигательных нарушений и многочисленных осложнений, таких как дисфункция моторики кишечника и мочевого пузыря [5], развитие вторичных инфекций [6] и ортостатических гипотензий [7], появление легочных [8] и сердечно-сосудистых заболеваний [9]. Кроме того, у многих пациентов ТСМ сопровождается расстройствами эмоционально-поведенческого характера, что, безусловно, негативно сказывается на эффективности нейрореабилитационных процедур [10]. В итоге более 50 % пациентов не могут полностью вернуться к нормальной повседневной жизни после ТСМ [11]. И хотя существующие в настоящий момент стратегии лечения последствий травмы могут значительно улучшить качество жизни пациентов, ни один из подходов не гарантирует полного восстановления утраченных функций и обеспечивает только поддерживающую помощь пациентам с пожизненной инвалидностью. Кроме того, на сегодняшний день ограничено понимание молекулярных и клеточных событий, которые могут лежать в основе повреждающих процессов после возникновения травмы.

Для повышения эффективности терапии необходимо глубокое понимание роли различных нейротрансмиттерных систем в реализации нейрореабилитационных механизмов. Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что одну из ключевых ролей в восстановлении двигательных функций конечностей при ТСМ играет серотонинергическая система, а различные способы повышения ее активности в ЦНС позволяют стимулировать нейрогенез в областях повреждения как головного, так и спинного мозга [12–14]. Известно, что аксоны серотонинергических нейронов (5-НТ нейронов) более устойчивы к повреждающему молекулярно-клеточному окружению в месте гибели тканей и подвергаются активному прорастанию и регенерации после травмы [15]. Таким образом, цель данного обзора – обобщение существующих данных экспериментальных и клинических исследований, подчеркивающих значимость 5-НТ механизмов в контексте устранения последствий ТСМ.

ПАТОГЕНЕЗ ТСМ

ТСМ – это повреждение тканей спинного мозга, которое приводит к временным или постоянным нарушениям двигательной, сенсорной или вегетативной функции мозга [2]. Клинические проявления ТСМ во многом зависят от тяжести и локализации поражения и могут включать частичную или полную потерю сенсорной и/или двигательной функций ниже уровня полученной травмы [16]. Независимо от локализации и степени полученной травмы патофизиология ТСМ включает в себя последовательный порядок событий, который можно разделить на две фазы [17].

Первичное повреждение при ТСМ возникает после механического воздействия на позвоночник, которое приводит к перелому или вывиху части позвонков, что, в свою очередь, травмирует или полностью разрывает ткани спинного мозга [1]. Основными механизмами первичного повреждения, воздействующего на позвоночник, являются компрессии, дистракции и смещения позвонков [18]. После получения травмы происходит прерывание как восходящих, так и нисходящих путей спинного мозга, разрушение кровеносных сосудов и клеточных мембран, что, в свою очередь, вызывает первичный спинальный шок, системную гипотензию и ишемию в месте повреждения [3]. В первую очередь в области травмы наблюдается повышенное кровотечение, ко-

торое далее вызывает локальное прекращение кровоснабжения, что приводит к гипоксии и ишемическим нарушениям. После полученной травмы происходит развитие спинального шока, который проявляется в виде потери функций спинного мозга каудально от места травмы, что может привести к параличу, прекращению контроля над кишечником и мочевым пузырем [19].

Патофизиологические механизмы второй фазы повреждения наблюдаются уже спустя несколько минут после первичного повреждения и могут продолжаться в течение дней, недель и даже месяцев, приводя к прогрессирующим повреждениям спинного мозга [20]. Вторичные повреждения по времени принято разделять на острую, подострую и хроническую фазы [21]. Острая фаза возникает сразу после полученного повреждения и включает в себя такие процессы как возникновение ионного дисбаланса, накопление нейротрансмиттеров, вызывающие эксайтотоксичность и образование свободных радикалов (окислительный стресс) [22, 23]. Сразу после первичного механического повреждения в ответ на быстрое повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} начинается каскад посттравматических реакций селективного окисления при участии радикальных форм кислорода, приводящих к накоплению супероксидов, которые потенциально могут реагировать с другими молекулами с образованием более опасных радикалов (например, при реакции с NO образуется пероксинитрит (ONOO^-)) [24, 25].

Все эти процессы формируют локальное воспаление, после чего происходит активация резидентных астроцитов и микроглиоцитов и последующая инфильтрация иммунных клеток крови, вызывая системный нейровоспалительный ответ [26] (рис. 1). Воспаление после TCM управляется многими типами клеток и многочисленными воспалительными цитокинами [27]. По мере прогрессирования повреждения начинается подострая фаза, которая включает апоптоз нейронов, демиелинизацию части выживших аксонов и изменение состава общего матрикса [28]. Через 7–10 дней в острой и подострой фазах TCM астроциты и перициты, которые в норме находятся в паренхиме спинного мозга, активно пролиферируют и мигрируют к месту повреждения, где участвуют в формировании глиального рубца [29]. Дальнейшие патологические изменения происходят уже в хронической фазе и включают образование кистозной полости, прогрессирующее отмирание аксонов и созревание образовавшегося рубца. Часто

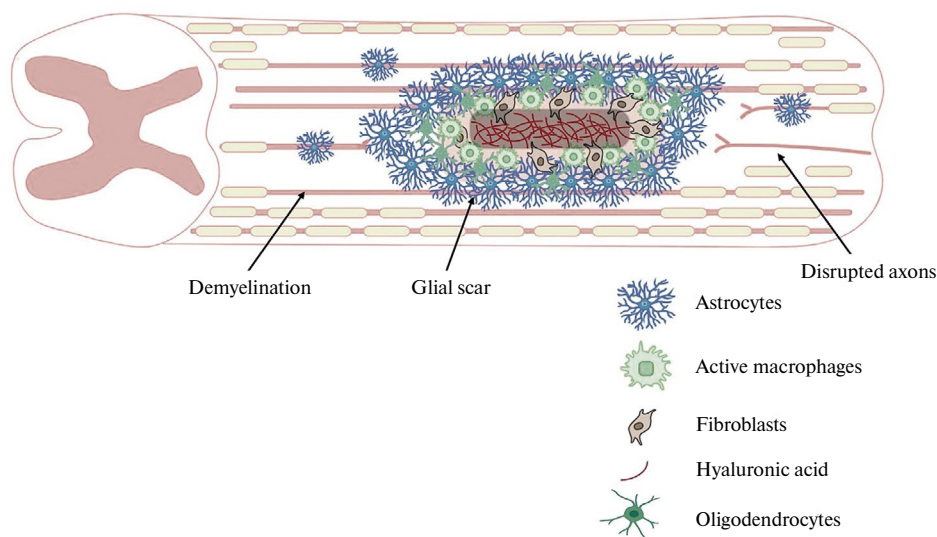


Рис. 1. Патогенетическая картина области повреждения спинного мозга.

в центре места повреждения могут образовываться заполненные жидкостью кисты, которые постепенно увеличиваются в размерах и вносят дополнительный вклад в гибель клеток за счет механического сдавливания и повреждения нервных волокон [30].

Процессы вторичного повреждения спинного мозга находятся под контролем сложных, комбинаторных и тесно взаимосвязанных молекулярных путей, которые вызывают множественные необратимые изменения как на клеточном, так и молекулярном уровнях. Эти изменения в целом в большей степени приводят к ухудшению функционального исхода после ТСМ, в основном из-за развития рубцовой ткани, индукции некроза и апоптоза нейронов.

ПСИХИЧЕСКИЕ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА ПОСЛЕ ТСМ

Эмоциональные, когнитивные и социальные последствия после ТСМ сильно индивидуализированы и варьируются в зависимости от периода после травмы и условий реабилитации каждого отдельного пациента [39]. Тем не менее по общим статистическим данным распространенность клинической депрессии среди пациентов с ТСМ оценивается в 22–28%; уровень клинической тревоги составляет около 20%; а показатели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) составляют около 12%, тогда как среди взрослого населения в целом частота клинической депрессии, тревоги и ПТСР составляет примерно 7, 3 и 3.5% соответственно [31]. Также было показано, что существует повышенный риск суицида среди людей с ТСМ по сравнению с общей популяцией, по оценкам 4–11% смертей после ТСМ связаны с самоубийством [32]. Особенно важно отметить, что наличие тревожно-депрессивных расстройств может сказываться на эффективности проводимых реабилитационных процедур у пациентов с ТСМ. Мотивация пациента по отношению к реабилитации является решающим фактором в адаптации к инвалидности, а хроническая боль, нерегулярный сон, употребление психоактивных веществ могут негативно повлиять на участие пациента в реабилитации, что в итоге может увеличить риск психологического стресса и снизить качество жизни после ТСМ.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ТСМ

Терапия острой фазы повреждения спинного мозга направлена на минимизацию прогрессирования первичного повреждения и предотвращение вторичных осложнений и включает в себя в первую очередь обеспечение работы дыхательной и кровеносной системы, а также стабилизацию позвоночника, позволяющую исключить последующую деформацию. Хирургическая помощь в основном ограничивается проведением хирургической декомпрессии [33]. На этом этапе терапия преимущественно направлена на лечение респираторных проблем и профилактику вторичных осложнений. Для дальнейшего ведения пациентов как в острый, так и в хронический период после ТСМ большое значение имеет реабилитация, направленная на улучшение двигательной функции и минимизацию вторичных повреждений [11]. Наиболее перспективными нейрореабилитационными подходами являются фармакотерапия, физические упражнения и использование эпидуральной электростимуляции.

Фармакологические подходы включают нейропротекцию с помощью препаратов, которые могут быть разделены на различные подгруппы в зависимости от механизма действия [41]. Подгруппы включают агонисты и антагонисты рецепторов нейротрансмиттеров, блокаторы ионных каналов, антиоксидантные и антиапоптотические средства [3].

Продемонстрирована эффективность реабилитационных физических упражнений как на животных моделях, так и в клинической практике. Было показано, что у мышей после латеральной гемисекции спинного мозга число аксонов в пределах 100

мкм от поражения было больше у тренированных на беговой дорожке животных [34]. У крыс с перерезанным спинным мозгом тренировки на беговой дорожке с нагрузкой на задние конечности и оптимизированным уровнем поддержки массы тела приводили к улучшениям локомоторной активности [35]. В клинической практике показано, что тренировка на беговой дорожке с поддержкой веса тела улучшает пространственно-временные параметры ходьбы у пациентов с неполным повреждением спинного мозга [52, 53]. Также у пациентов с неполной травмой спинного мозга высокоинтенсивные тренировки на беговой дорожке вызывают повышенную мышечную активность, улучшение кинематических показателей локомоции, а также увеличивают максимальную скорость ходьбы [54].

Также перспективно использование электрической стимуляции, которая, как было показано в многочисленных современных исследованиях, обеспечивает функциональное восстановление и даже предотвращает многие осложнения после ТСМ [13, 36–39]. Электрическая стимуляция поясничного отдела позвоночника может восстановить двигательную активность у крыс с ТСМ [40], а также у приматов [41]. В клиническом исследовании на пациентах с хронической ТСМ шейного отдела использование чрескожной электрической стимуляции спинного мозга привело к быстрому и устойчивому восстановлению функциональности конечностей даже после полного паралича, кроме этого, наблюдалось уменьшение спастичности и улучшение вегетативных функций, включая нормализацию работы мочевого пузыря. При этом данные эффекты сохранялись в течение как минимум трех – шести месяцев после курса стимуляции, что указывает на функциональное восстановление, опосредованное долгосрочной нейропластичностью [42]. Известно, что нисходящие сигналы от головного мозга достигают корково-спинномозгового синапса передних рогов одновременно с проходящими вверх сигналами от электрической стимуляции, приводя к укреплению синаптической связи [43].

СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

5-НТ является важным моноаминовым нейротрансмиттером, который модулирует нейронную активность и широкий спектр нейropsychологических процессов, а препараты, воздействующие на серотониновые рецепторы, широко используются в психиатрии и неврологии [44].

На первом этапе синтеза 5-НТ аминокислота триптофан путем гидроксирования с помощью ТРН (Триптофангидроксилаза) в 5-гидрокситриптофан (5-НТР). Затем данный промежуточный продукт (5-НТР) в процессе органического декарбоксилирования превращается в 5-НТ с помощью лимитирующего фермента декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) [45]. Известно о существовании двух изоформ ТРН (1-го и 2-го типа), при этом ТРН2 (Триптофангидроксилаза 2-го типа) присутствует именно в центральной нервной системе, тогда как ТРН1 в основном экспрессируется в шишковидной железе и на периферии [46].

Основным регулятором уровня 5-НТ в мозге является серотониновый транспортер (SERT), который путем повторного поглощения внеклеточного 5-НТ обратно в пресинаптический нейрон регулирует серотонинергическую нейротрансмиссию. Следовательно, SERT является основной мишенью для таких препаратов, как селективные ингибиторы обратного захвата 5-НТ, которые могут увеличить доступность 5-НТ в мозге и являются препаратами для лечения депрессии. Ферментативное расщепление 5-НТ в мозге и периферических тканях в основном обеспечивается посредством его окислительного дезаминирования митохондриально-связанным ферментом моноаминоксидазой. Ингибиторы моноаминоксидазы ответственны за блокирование данного фермента, тем самым их прием приводит к повышению уровня моноаминов [47].

5-НТ ИННЕРВАЦИЯ СПИННОГО МОЗГА

После открытия анатомической локализации путей 5-НТ в мозге крыс [48] было обнаружено, что 5-НТ нейроны сконцентрированы в ядрах шва (*raphe nuclei*) продолговатого мозга (рис. 2). Ядра шва представляют собой скопления нейронов с плохо выраженными цитоархитектоническими границами, которые располагаются по бокам срединной линии вдоль ростокаудального продолжения ствола мозга [68]. Кластеры 5-НТ нейронов можно разделить, исходя из их распределения и основных проекций, на две группы: ростральную группу с основными проекциями в передний мозг и каудальную группу с основными проекциями в ствол мозга и тремя параллельными проекциями на дорсальный, промежуточный и вентральный столбы спинного мозга [49]. Каудальная группа включает в себя три ядра [50] (*nucleus raphe obscurus* – темное ядро шва, *nucleus raphe magnus* – большое ядро шва, *nucleus raphe pallidus* – бледное ядро шва), а также одну популяцию нейронов в латеральной ретикулярной формации. 5-НТ отростки, иннервирующие задние рога, преимущественно исходят через дорсолатеральный канатик, который также имеет редкие отростки в вентральных рогах. Нейроны бледного и темного ядра шва проецируются в вентролатеральное белое вещество, а также оканчиваются на мотонейронах в вентральных рогах и в промежуточном сером веществе через вентральные и вентролатеральные канатики соответственно. 5-НТ аксоны разветвляются на больших участках, при этом вентральные и промежуточные

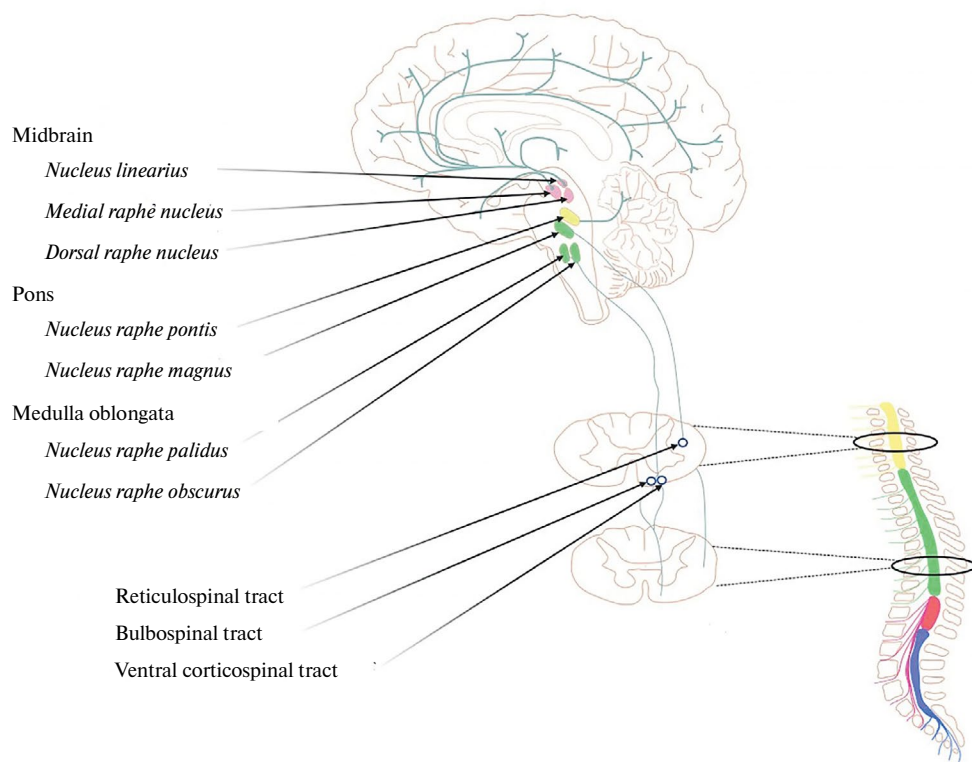


Рис. 2. Нисходящие серотонинергические проекции, иннервирующие спинальные нейронные сети.

проекции образуют синапсы с мотонейронами, а дорсальные проекции опосредуют иннервацию путем паракринной или объемной передачи сигнала [51]. 5-НТ аксоны проецируются во все области серого вещества спинного мозга, но особенно плотно распределены в поверхностных дорсальных рогах, области спаек и вентральных рогах. Нейротрансмиссия 5-НТ в спинном мозге модулирует сенсорные, моторные и вегетативные функции, при этом коллатерали аксонов от одного нейрона способны иннервировать как сенсорные, так и моторные ядра вегетативной системы на разных уровнях спинного мозга [52].

РОЛЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В КОНТРОЛЕ ДВИГАТЕЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ

Высвобождение 5-НТ в вентральных рогах спинного мозга играет важную роль в реализации двигательной функции. 5-НТ может как стимулировать, так и ингибировать двигательную функцию [53, 54]. Множественные рецепторы 5-НТ экспрессируются мотонейронами в спинном мозге, и в целом 5-НТ повышает их возбудимость непосредственно за счет активации рецепторов и последующей модуляции ионных каналов [55, 56]. 5-НТ активирует каналы K^+ и Na^+ , которые деполяризуют мотонейроны до порога активации, ингибирует проводимость активированного Ca^{2+} и K^+ , тем самым увеличивая частоту возбуждения мотонейронов; и индуцирует постоянный внутренний ток, опосредованный потенциалзависимыми Ca^{2+} - и Na^+ -каналами, что приводит к постоянной деполяризации мотонейронов и усилению синаптического входа [56]. Кроме того, 5-НТ модулирует возбудимость мотонейронов через влияние на интернейроны спинного мозга [57]. Серотонинергическая система также воздействует на регуляцию ритма и координацию движений, так как является нейромодулятором активности спинального центра генерации паттернов [58].

5-НТ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Регуляция функции мочевого пузыря опосредована вегетативной (симпатической и парасимпатической) и соматической нервной системами. Симпатический путь ингибирует сокращение детрузора мочевого пузыря, способствуя удержанию мочи. При увеличении объема мочи и, следовательно, повышении внутрипузырного давления парасимпатический путь запускает сокращение детрузора мочевого пузыря, тем самым обеспечивая опорожнение пузыря. [59]. Параллельно существует также скоординированное взаимодействие между вегетативным мочевым пузырем и активностью соматических мышц сфинктера, регулируемое на корковом и подкорковом уровнях [60]. Первоначальные анатомические исследования в 1964 г. идентифицировали плотные 5-НТ аксоны, иннервирующие симпатические и парасимпатические ядра по всему спинному мозгу, что свидетельствует о 5-НТ-опосредованной модуляции вегетативной нервной системы [61]. Более поздние исследования подтвердили, что каудальные проекции 5-НТ, особенно из большого ядра шва, участвуют в регуляции активности мочевого пузыря [62]. 5-НТ контролирует функцию мочевого пузыря на нескольких уровнях, включая парасимпатический вход и соматическую иннервацию наружного уретрального сфинктера [44]. Электрическая стимуляция большого ядра шва (В3) подавляет мочеиспускание, блокируя ритмичные сокращения мочевого пузыря [63]. Более свежие данные свидетельствуют о том, что опосредованный 5-НТ эффект на функцию мочевого пузыря зависит от активации отдельных рецепторов [64]. Кроме того, есть сообщения о различиях в воздействии 5-НТ на мочеиспускание в зависимости от вида. Например, активация рецепторов 5-НТ1А, 5-НТ2А/2С, 5-НТ4 и 5-НТ7 у крыс способствует мочеиспусканию [65, 66]. Точно так же активация рецепторов 5-НТ1 и 5-НТ2

облегчает мочеиспускание у кроликов [67]. Однако активация рецептора 5-HT_{1A} подавляет мочеиспускание у кошек [68].

ВЛИЯНИЕ ТСМ НА НЕЙРОТРАНСМИССИЮ 5-НТ

Известно, что 5-НТ нейроны обладают повышенной способностью к регенерации или прорастанию после повреждений в ЦНС, в том числе и после ТСМ. Через 3 месяца после ТСМ происходит значительное снижение числа аксонов 5-НТ нейронов каудально от тяжелой контузии и больше сохранных нейронов каудально от средней тяжести контузии, при этом окрашивание на 5-НТ переносчик (SERT) показало, что травма вызывала даже большую пропорциональную потерю SERT, чем самих 5-НТ аксональных отростков [69]. Эти данные могут отражать энергетический выбор 5-НТ нейронов производить меньше транспортеров в выживших аксонах. На модели гемисекции в грудном отделе у крыс было обнаружено, что плотность 5-НТ нервных волокон как в промежуточной зоне, так и в области мотонейронов вентральных рогов была резко уменьшена на стороне повреждения спустя 60 дней после повреждения. После контузии и дорсальной гемисекции дорсальные 5-НТ проекции подвергаются серьезной дегенерации, в то время как вентральные проекции сохраняются [69, 70]. Это указывает на пластические изменения, которые могут происходить в спинном мозге с частичным повреждением, что может иметь как благоприятное, так негативное воздействие на двигательную функцию после ТСМ. Хотя пластические изменения могут привести к адаптивной компенсации утраченных трансмиссиверов и таким образом способствовать восстановлению двигательных функций, они также могут привести к множеству неадаптивных последствий, таких как спастичность.

Важный вопрос касается внутреннего механизма, который позволяет именно 5-НТ аксонам не только выживать в ингибирующей среде, но также активно прорасти и регенерировать после поражений ЦНС. Один из самых повреждающих компонентов внеклеточного матрикса после травмы спинного мозга – хондроитинсульфатпротеогликан (CSPG). Было показано, что 5-НТ аксоны демонстрируют сниженное ингибирование в присутствии CSPG [71]. По литературным данным, эта повышенная способность 5-НТ нейронов к устойчивому росту при высоких количествах CSPG может быть частично связана со значительно более высоким по сравнению с кортикальными нейронами содержанием ассоциированного с ростом белка GAP-43 и/или интегрин $\beta 1$. Авторы другого исследования предполагают, что 5-НТ аксоны экспрессируют высокие уровни протеаз, которые разрушают CSPG, что может способствовать их выживанию и прорастанию в условиях повреждения [72, 73]. На разрастание аксонов 5-НТ после ТСМ может влиять присутствие миелиновых ингибиторов, в том числе: Nogo, олигодендроцит-миелиновый гликопротеин (OMgp) и миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG) [74–76]. Все три эти антирегенеративные белки связываются с рецептором Nogo-66, который экспрессируется среди прочего 5-НТ-нейронами и может предотвращать их прорастание и возможную регенерацию после ТСМ [77]. Другие исследовательские группы делали акцент на продуцировании 5-НТ клетками AADC (названы из-за повышенной в них экспрессии декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (AADC)), находящимися в спинном мозге, демонстрируя, что после полного разреза спинного мозга клетки AADC повышают свою эффективность в катализе 5-НТ [78, 79]. После полного пересечения спинного мозга крысы клетки AADC, расположенные дистальнее очага поражения, приобретают способность продуцировать 5-НТ из 5-гидрокситриптофана [78]. Кроме того, публикуются данные, свидетельствующие о том, что другая возможность, которая может лежать в основе прорастания и регенерации аксонов 5-НТ после повреждения ЦНС, заключается в отсутствии у них классических синаптических контактов. Нейротрансмиссия 5-НТ преимущественно происходит посредством объемной передачи, которая включает диффузию через внеклеточное пространство [80].

ПОТЕНЦИАЛ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ФУНКЦИОНАЛЬНОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОСЛЕ ТСМ

Существует несколько стратегий, используемых для повышения нейротрансмиссии 5-НТ в ЦНС. Самым простым немедикаментозным подходом является увеличение потребления предшественника 5-НТ – 5-гидрокситриптофана (5-НТР), который может выступать как лекарственным средством, так и естественным компонентом некоторых пищевых добавок. Блокирование обратного захвата 5-НТ также увеличивает нейротрансмиссию 5-НТ и обычно используется в качестве антидепрессивного препарата. Помимо модуляции серотонинергической нейротрансмиссии и воздействия на регенерирующие аксоны, лечение СИОЗС также продемонстрировало способность поддерживать важный механизм регенерации нейронов – увеличение образования новых нейронов. Также еще одной стратегией воздействия на серотонинергическую систему является использование агонистов 5-НТ рецепторов, с помощью которых можно избирательно активировать различные подтипы рецепторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЖИВОТНЫХ 5-НТ

Острое интратекальное введение непосредственно самого 5-НТ крысам спустя месяц после латеральной гемисекции спинного мозга снижало проявление механической аллодинии и температурной гиперальгезии [81]. Хроническое (1–3 недели) интратекальное введение 5-НТ вместе с механической стимуляцией хвоста у крыс с перерезкой спинного мозга в грудной области увеличивало длительность локомоторных эпизодов, способствовало нормализации функции поддержки веса тела, улучшило внутриконечностную координацию и увеличивало амплитуду электромиографической активности мышц задних конечностей [82].

5-гидрокситриптофан

Введение прекурсора 5-НТ оказывало положительное влияние на функциональное состояние животных после ТСМ. Например, у крыс однократное введение 5-гидрокситриптофана в физиологических дозах вызывало электрическую активность в мышцах задних конечностей на 20-й день после перерезки спинного мозга в грудном отделе и тоническую активность диафрагмальных мотонейронов при перерезке на уровне шейного отдела [83]. В другом исследовании введение 5-гидрокситриптофана приводило к облегчению сгибательного рефлекса в задних конечностях крыс спустя 2 месяца после перерезки [84]. Аналогично у кошек с перерезкой спинного мозга в грудном отделе инъекция 5-гидрокситриптофана незадолго до локомоторного тестирования способствовала увеличению длины шага, а также амплитуды мышечной активности мышц-сгибателей и разгибателей задних конечностей [85]. При введении 5-гидрокситриптофана в комбинации с карбидопой (вещества, увеличивающего доставку 5-гидрокситриптофана в ЦНС) крысам с контузионным повреждением спинного мозга было отмечено значимое улучшение двигательной функции задних конечностей даже при тяжелом поражении [69].

Селективные ингибиторы обратного захвата 5-НТ

Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) действуют, блокируя переносчик 5-НТ (SERT), ингибируя обратный захват 5-НТ и, следовательно, повышая внеклеточные уровни 5-НТ и серотонинергическую нейротрансмиссию.

Было показано, что флуоксетин улучшил функцию мочеиспускания у мышей с умеренными ушибами позвоночника, однако лечение не оказало никакого влияния на функцию мочеиспускания у мышей с тяжелой контузией позвоночника, это может

указывать на то, что все нисходящие 5-НТ аксоны могут быть разорваны [86]. Раннее введение эсциталопрама помогало предотвратить возникновение спастичности у крыс посредством регуляции 5-НТ системы после контузионного повреждения спинного мозга [87]. Однако в другом исследовании как краткосрочное, так и долговременное лечение циталопрамом на модели крыс с контузионным повреждением спинного мозга не показало общего положительного влияния на двигательную активность или распространение поражения [88].

Агонисты 5-НТ-рецепторов

На животных моделях неоднократно было показано, что после перерезки спинного мозга двигательная активность может быть восстановлена при введении препаратов, активирующих рецепторы 5-НТ. Введение антагонистов рецептора 5-НТ₇ приводило к снижению продолжительности шагового цикла, что согласуется с действием на нейроны, участвующими в функции генерации ритма центрального генератора паттернов, а введение антагонистов 5-НТ₂-рецепторов снижало амплитуду активности вентральных корешков, оказывая лишь небольшое влияние на продолжительность шагового цикла, указывая на непосредственное действие на мотонейроны и премоторные клетки. Количественный анализ движений в сочетании с фармакологическими тестами с использованием селективных антагонистов к рецепторам 5-НТ_{2A}, 5-НТ_{2B} или 5-НТ_{2C} перед лечением показал, что рецептор 5-НТ_{2A} имеет ключевое значение для активации локомоторной сети, поскольку локомоция не индуцировалась кvipазином (преимущественно агонист рецепторов 5-НТ_{2A}) у животных, предварительно получавших антагонист 5-НТ_{2A}-рецепторов.

В других работах было показано успешное использование агонистов 5-НТ в комбинации с ЭЭС (эпидуральная электростимуляция) [89, 90]. В первом исследовании после полной перерезки спинного мозга были удалены все супраспинальные входы и в качестве терапевтического лечения использовались комбинации 5-НТ агонистов и эпидуральной электростимуляции. В результате в ходе восстановления уже через одну неделю после травмы была зафиксирована реорганизация спинальных сетей из нефункциональных в высокофункциональные и адаптивные состояния. В данном эксперименте вводили препарат кvipазин (преимущественно агонист 5-НТ_{2A}) и 8-ОНДРАТ (агонист 5-НТ_{1A} и 5-НТ₇), при этом оба агониста способствовали улучшению передвижения животных с травмой на беговой дорожке после нескольких недель восстановления. В другом исследовании [89] эксперименты проводили на взрослых крысах, которым была проведена полная среднегрудная перерезка спинного мозга. Исследование показало, что стимуляция рецепторов 5-НТ_{1A}, 5-НТ_{2A/2C}, 5-НТ₃ и 5-НТ₇ опосредовала значительные и специфические изменения в локомоторных паттернах в сочетании с ЭЭС. Введение агониста 5-НТ_{1A/7}-рецепторов заметно модулировало паттерны, кроме того, наблюдалось улучшение межконечностной координации, снижение кинематической изменчивости, повышение грузоподъемности, а также общее облегчение движений и сгибаний. Активация рецепторов 5-НТ_{2A/C} приводила к явному облегчению интегрального показателя (компоненты), связанного с удержанием веса и растягиванием конечностей. При использовании агониста 5-НТ₃-рецепторов было зафиксировано значительное снижение изменчивости времени походки и волочения лапы.

Клеточная терапия

В исследовании на животных 5-НТ клеточные линии [58, 81, 91] и 5-НТ-трансплантаты ядер шва [92, 93] использовались для улучшения функциональных нарушений, связанных с травмой. Было показано, что клеточная терапия после ТСМ способствует созданию среды, которая может уменьшить локальное повреждение и способствовать регенерации во многих популяциях аксонов, включая нисходящие спинальные 5-НТ

волокна [94]. Кроме того, клеточная терапия может обратить вспять 5-НТ передачу после повреждения спинного мозга и ослабить возникшую нейропатическую боль за счет снижения повышенной возбудимости в задних рогах [95]. Трансплантация эмбриональных нейронов ствола мозга в спинной мозг с травмой в грудном сегменте показала, что эти нейроны способны обеспечивать 5-НТ иннервацию поясничного отдела спинного мозга [96]. Интраспинальные трансплантаты клеточной линии hNT2.19 (активно секретируют 5-НТ) использовались для повышения уровня 5-НТ вблизи поясничных двигательных путей и для улучшения двигательной функции у крыс после тяжелой контузионной ТСМ [97]. Тактильная аллодиния задней лапы и термическая гипералгезия, вызванные тяжелой контузионной травмой спинного мозга, были полностью купированы поясничной субарахноидальной трансплантацией дифференцированных клеток. Важно отметить, что такая клеточная терапия проходит без осложнений после трансплантации и, следовательно, может служить как полезной дополнительной адъювантной терапией, так и в перспективе стать заменой существующим фармакологическим методам лечения ТСМ.

КЛИНИЧЕСКАЯ ПРАКТИКА

В клинических случаях прием СИОЗС при реабилитации после ТСМ назначается при наличии у пациентов хронического болевого синдрома и/или депрессивных эпизодов, при этом подобное медикаментозное лечение подбирается индивидуально, учитывая конкретный препарат и его дозировку, так как они имеют определенные противопоказания и могут вызывать ряд побочных эффектов [88, 89]. Проведенный метаанализ клинических случаев показал, что прием антидепрессантов из группы СИОЗС эффективен для снижения нейропатической боли при спинномозговой травме, однако стоит учитывать, что эффекты терапии могли усиливаться сопутствующим лечением и данные неоднородны из-за различных дозировок у каждого пациента [98]. В другом клиническом исследовании изучали рефлекторную реакцию вибрации сухожилий у здоровых людей под влиянием селективного ингибитора обратного захвата 5-НТ эсциталопрама, при этом препарат назначался пациентам единократно во время исследования [99]. Вибрация сухожилий в первую очередь активирует афференты мышечных веретен, которые моносинаптически проецируются на спинальные мотонейроны и таким образом представляют собой спинально-опосредованный ответ. Было обнаружено, что скорость развития силы, вызванная постоянными вибрационными стимулами, была значительно выше при приеме эсциталопрама, чем без него. Thompson & Hornby исследовали влияние 5-НТ препаратов на двигательную функцию у людей с хронической ТСМ [100]. Оценивали клинические показатели силы, наличие спастичности и паттерны ходьбы у группы пациентов из 12 человек с хронической неполной ТСМ после однократного введения либо 8 мг ципрогептадина (антагониста 5-НТ), либо 10 мг эсциталопрама (селективного ингибитора обратного захвата 5-НТ). Результаты показали, что препараты влияют на ходьбу: антагонисты 5-НТ снижали клинические показатели силы и спастичности, тогда как СИОЗС увеличивали как силу, так и спастичность. Эти изменения согласуются с нарушением регуляции чувствительных к 5-НТ нейронов спинного мозга после ТСМ. Стоит уточнить, что подобные исследования с однократным приемом препаратов в безопасных дозировках не вполне отражают влияния медикаментозных агентов при длительном приеме и опосредованном накопительном эффекте.

ВЛИЯНИЕ 5-НТ НА ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИ ТСМ

Антидепрессанты, такие как СИОЗС, специфически повышают уровень 5-НТ в синаптической щели и широко используются для лечения аффективных и тревожных расстройств. Результаты исследований с использованием нокаутных животных

демонстрируют важную роль серотонинергической системы в развитии тревожного поведения [101–104]. Интересной особенностью 5-НТ препаратов является то, что они способны изменять уровень 5-НТ в ЦНС в течение нескольких часов после введения, однако свой клинический эффект они развивают в течение как минимум 2 недель. Это несоответствие, а также тот факт, что антидепрессанты способны индуцировать в течение 2–4 недель образование новых синаптических связей, привели к возникновению гипотезы о том, что эти препараты реализуют свои поведенческие эффекты за счет усиления нейрогенеза. Многочисленные исследования показывают, что передача сигналов рецепторов 5-НТ1А и 5-НТ4 в зубчатой извилине гиппокампа способствует опосредованному СИОЗС стимулированию нейрогенеза и увеличению экспрессии нейротрофических факторов. Например, у мышей дикого типа хроническое (но не острое) введение флуоксетина стимулировало нейрогенез в зубчатой извилине и вызывало снижение тревожности в тесте на гипонеофагию [104]. У мышей, нокаутных по гену 5НТ1А-серотониновых рецепторов, ни нейрогенеза, ни анксиолитического действия при введении флуоксетина обнаружено не было. Таким образом, в настоящее время 5-НТ система и, в частности, 5НТ1А-серотониновые рецепторы рассматриваются как одни из главных мишеней действия антидепрессантов и противотревожных средств. Данные экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что реализация эффектов этих препаратов связана с их способностью стимулировать нейрогенез. В то время как способность к делению нервных клеток в нейрогенных зонах головного мозга известна уже не один десяток лет, возможность нейрогенного потенциала эндимальных клеток центрального канала спинного мозга является темой ак-

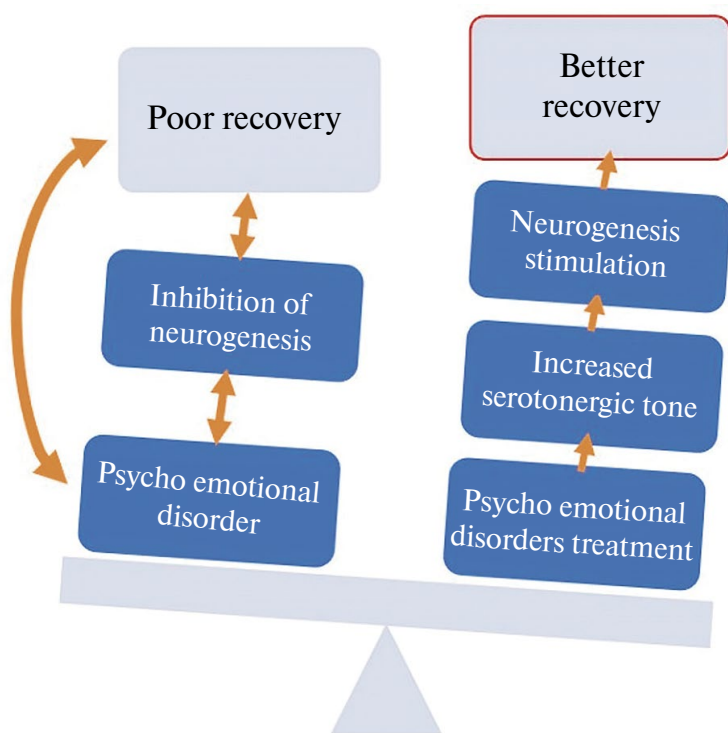


Рис. 3. Связь выраженности психоэмоциональных расстройств и эффективности нейрореабилитационных процедур.

тивных дискуссий [105–107]. При TCM эти клетки начинают активно подвергаться процессам пролиферации и дифференцировки, образуя в большей степени астроциты и частично олигодендроциты, но не нейроны [106]. Тем не менее в экспериментах на грызунах показано, что эта система не является стационарной и некоторые факторы могут способствовать образованию нейронов из эпендимальных клеток. Таким фактором может быть фармакологическое воздействие, например, показано, что добавление вальпроевой кислоты к эмбриональным стволовым клеткам головного мозга, трансплантированным в спинной мозг, привело к продукции не только новых астроцитов, но и нейронов. Эти дифференцированные нейроны смогли подключиться к существующим спинальным нейрональным сетям и образовать синаптические связи с эндогенными нейронами, что привело к функциональному улучшению у мышей после TCM [108]. Также известно, что TCM сопровождается вторичным повреждением, которое приводит к подавлению регенерации аксонов и отрицательно влияет на дифференцировку активированных эпендимальных клеток в нейроны [109]. В связи с этим возникает логичное предположение, что эмоционально-поведенческие расстройства при TCM могут влиять и на нейрогенез непосредственно в спинном мозге, действуя на баланс образования нейронов и глиальных клеток за счет активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (рис. 3). В таком случае изучение роли системы 5-НТ в механизмах регуляции нейрогенеза в спинном мозге становится особенно актуальной темой исследования.

УНИКАЛЬНОСТЬ КРЫС TRH2 КО КАК МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИОННЫХ МЕХАНИЗМОВ

Известно, что около 99% всего 5-НТ в организме млекопитающих находится на периферии (в особенности, в кишечнике и коже) и только 1% – в головном и спинном мозге. TRH2 – уникальный фермент, участвующий в образовании 5-НТ из его предшественника, триптофана, в пределах ЦНС. До недавнего времени в распоряжении научных лабораторий были только мыши с нокаутом гена TRH2, используемые для изучения в большей степени поведенческих изменений, возникающих при дефиците 5-НТ в ЦНС [110, 111]. Несмотря на большую привлекательность таких животных для изучения механизмов и особенностей восстановления двигательных и висцеральных функций при поражении ЦНС, на сегодняшний день не было опубликовано таких работ. Возможно, это может быть связано с тем, что мыши являются не очень удобным модельным объектом для изучения двигательного поведения из-за малого размера, а также высокой подвижности. Ввиду этого в таких исследованиях отдается предпочтение более крупным лабораторным животным, таким как крысы. Стоит отметить, что большинство известных в настоящее время патогенетических механизмов, сопровождающих TCM, а также терапевтических подходов к лечению двигательных и висцеральных расстройств у пациентов было изучено именно в экспериментах на крысах [112]. Например, на крысах было изучено влияние кальпаин-индуцированного повреждения липидов и белков на протекание травмы, вклад нейровоспаления в протекание вторичного повреждения, а также процессы демиелинизации и дегенерации олигодендроцитов [113] и общие механизмы патофизиологии компрессионных и контузионных TCM [114]. Также крысы используются в качестве животных моделей в фармакологических разработках, нацеленных на нейропротекцию и аксональную регенерацию [114].

Крысы TRH2-КО (нокаутные по TRH2) были получены с использованием метода «цинковых пальцев» из линии крыс *Dark agouti* [115]. При количественном анализе содержания моноаминов в ЦНС методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было установлено, что у TRH2-КО крыс полностью отсутствуют 5-НТ, а также

5-гидроксииндолуксусная кислота (метаболит 5-НТ) в переднем мозге, гипоталамусе, промежуточном мозге, варолиевом мосту, продолговатом мозге и шейном отделе спинного мозга. В то же время у таких животных количество других моноаминов, норадреналина и дофамина было аналогично таковому у животных дикого типа. Эти данные подтверждают эффективность и избирательность блокады синтеза 5-НТ в ЦНС предложенным генетическим методом. Появление ТРН2-КО крыс в арсенале исследователей в области биомедицины позволяет получать большое количество данных благодаря множеству существующих сенсомоторных и поведенческих тестов. Кроме того, крысы являются более сложным и совершенным модельным объектом по сравнению с мышами, что значительно повышает трансляционный потенциал проводимых на них исследований. Таким образом, крысы ТРН2-КО являются привлекательным модельным объектом для изучения механизмов восстановления двигательных и висцеральных функций при ТСМ. Учитывая, что влияние отсутствия синтеза 5-НТ в ЦНС на нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа – установленный факт [116], существует значительная вероятность влияния 5-НТ на нейрогенез и в спинном мозге, и изучение того, как эти изменения влияют на восстановление и регенерацию нейронов после ТСМ, может помочь углубить представления о механизмах восстановления. Учитывая роль 5-НТ в вегетативной регуляции, крысы ТРН2-КО могут быть полезны для изучения восстановления висцеральных функций, таких как контроль мочевого пузыря и моторика желудочно-кишечного тракта, страдающих при ТСМ. Помимо непосредственного влияния отсутствия 5-НТ на восстановительные процессы и, таким образом, установления роли 5-НТ в этих процессах, есть вероятность обнаружить компенсаторные механизмы, возникающие в отсутствие 5-НТ, тем самым выявляя альтернативные сигнальные пути или системы нейромедиаторов, которые могут способствовать функциональному восстановлению. Более того, у крыс ТРН2-КО наблюдаются значительные поведенческие отличия от дикого типа, включающие повышенную агрессию и сниженную тревожность [117], и изучение влияния этих поведенческих отличий на функциональное восстановление после ТСМ могло бы выявить потенциальное взаимодействие между 5-НТ регуляцией, поведением и восстановительными процессами. Также крыс ТРН2-КО можно использовать в фармакологических исследованиях для проверки эффективности и безопасности терапий на основе 5-НТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТСМ является важной медико-социальной проблемой, затрагивающей тысячи людей ежегодно вне зависимости от их возраста, пола, социальной или этнической группы. Последствия ТСМ тяжело поддаются лечению из-за сложных и малоизученных патофизиологических механизмов, лежащих в основе как первичного, так и вторичного повреждения, поэтому на данный момент еще не разработали протокол лечения, который был бы эффективным и универсальным для лечения пациентов с ТСМ. Ряд экспериментальных исследований на животных, а также некоторые клинические исследования дают основания полагать, что серотонинергическая система в пределах головного и спинного мозга является важным эндогенным ресурсом, активирующим процессы нейропластичности и нейрореабилитации при поражении ЦНС, в том числе и при ТСМ. Повышение нейротрансмиссии 5-НТ путем фармакотерапии или клеточной терапии является многообещающим подходом коррекции двигательной, висцеральной и психоэмоциональной дисфункции после ТСМ, но требуется больше трансляционных и клинических исследований для понимания опосредованных серотонинергической системой механизмов лечения, для более осознанного подбора терапии при ТСМ, и использование крыс ТРН2-КО в качестве модельного организма может стать важным шагом в продвижении этих исследований.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (П. Е. М., Ю. И. С.), сбор и анализ литературных данных, написание рукописи, подготовка иллюстраций (С. П. К., А. В., К. А. А., Ю. И. С.), обсуждение и одобрение финальной версии (П. Е. М., Ю. И. С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» NRB-BFT-2406. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S* (2019) Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol* 10: 282.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>
2. *Chen Y, Tang Y, Vogel LC, Devivo MJ* (2013) Causes of spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 19(1): 1–8.
<https://doi.org/10.1310/sci1901-1>
3. *Anjum A, Yazid MD, Fauzi Daud M, Idris J, Ng AMH, Selvi Naicker A, Ismail OHR, Athi Kumar RK, Lokanathan Y* (2020) Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Int J Mol Sci* 21(20).
<https://doi.org/10.3390/ijms21207533>
4. *Yang T, Dai Y, Chen G, Cui S* (2020) Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury. *Front. Cell Neurosci* 14.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00078>
5. *Wheeler TL, de Groat W, Eisner K, Emmanuel A, French J, Grill W, Kennelly MJ, Krassioukov A, Gallo Santacruz B, Biering-Sørensen F, Kleitman N* (2018) Translating promising strategies for bowel and bladder management in spinal cord injury. *Exp Neurol* 306: 169–176.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.05.006>
6. *Farhad A, Soolmaz K* (2017) Infectious Complications after Spinal Cord Injury. In: Yannis D, (ed). *Essentials of Spinal Cord Injury Medicine*. Rijeka. IntechOpen. Ch 5.
7. *Claydon VE, Steeves JD, Krassioukov A* (2006) Orthostatic hypotension following spinal cord injury: understanding clinical pathophysiology. *Spinal Cord* 44(6): 341–351.
<https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101855>
8. *Cardozo CP* (2007) Respiratory complications of spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 30(4): 307–308.
<https://doi.org/10.1080/10790268.2007.11753945>
9. *Myers J, Lee M, Kiratli J* (2007) Cardiovascular disease in spinal cord injury: an overview of prevalence, risk, evaluation, and management. *Am J Phys Med Rehabil* 86(2): 142–152.
<https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e31802f0247>
10. *Budd MA, Gater DR, Jr, Channell I* (2022) Psychosocial Consequences of Spinal Cord Injury: A Narrative Review. *J Pers Med* 12(7).
<https://doi.org/10.3390/jpm12071178>
11. *Nas K, Yazmalar L, Şah V, Aydın A, Öneş K* (2015) Rehabilitation of spinal cord injuries. *World J Orthop* 6(1): 8–16.
<https://doi.org/10.5312/wjo.v6.i1.8>
12. *Gerin CG, Hill A, Hill S, Smith K, Privat A* (2010) Serotonin release variations during recovery of motor function after a spinal cord injury in rats. *Synapse* 64(11): 855–861.
<https://doi.org/10.1002/syn.20802>

13. *Moshonkina TR, Shapkova EY, Sukhotina IA, Emeljannikov DV, Gerasimenko YP* (2016) Effect of Combination of Non-Invasive Spinal Cord Electrical Stimulation and Serotonin Receptor Activation in Patients with Chronic Spinal Cord Lesion. *Bull Exp Biol Med* 161(6): 749–754. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3501-4>
14. *Perrin FE, Noristani HN* (2019) Serotonergic mechanisms in spinal cord injury. *Exp Neurol* 318: 174–191. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.05.007>
15. *Fauss GNK, Hudson KE, Grau JW* (2022) Role of Descending Serotonergic Fibers in the Development of Pathophysiology after Spinal Cord Injury (SCI): Contribution to Chronic Pain, Spasticity, and Autonomic Dysreflexia. *Biology* (Basel) 11(2). <https://doi.org/10.3390/biology11020234>
16. *Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, Johansen M, Jones L, Krassioukov A, Mulcahey MJ, Schmidt-Read M, Waring W* (2011) International standards for neurological classification of spinal cord injury (revised 2011). *J Spinal Cord Med* 34(6): 535–546. <https://doi.org/10.1179/204577211x13207446293695>
17. *Anjum A, Yazid MDi, Fauzi Daud M, Idris J, Ng AMH, Selvi Naicker A, Ismail OHR, Athi Kumar RK, Lokanathan Y* (2020) Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Int J Mol Sci* 21(20): 7533. <https://doi.org/10.1007/s10143-018-1008-3>
18. *Quadri SA, Farooqui M, Ikram A, Zafar A, Khan MA, Suriya SS, Claus CF, Fiani B, Rahman M, Ramachandran A, Armstrong IIT, Taqi MA, Mortazavi MM* (2020) Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury. *Neurosurg Rev* 43(2): 425–441. <https://doi.org/10.1007/s10143-018-1008-3>
19. *Bonner S, Smith C* (2013) Initial management of acute spinal cord injury. *CEACCP* 13(6): 224–231. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkt021>
20. *McDonald JW, Sadowsky C* (2002) Spinal-cord injury. *Lancet* 359(9304): 417–425. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)07603-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)07603-1)
21. *Bilgen M, Abbe R, Liu S-J, Narayana PA* (2000) Spatial and temporal evolution of hemorrhage in the hyperacute phase of experimental spinal cord injury: In vivo magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 43(4): 594–600. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2594\(200004\)43:4<594::AID-MRM15>3.0.CO;2-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2594(200004)43:4<594::AID-MRM15>3.0.CO;2-1)
22. *Von Leden RE, Yauger YJ, Khayrullina G, Byrnes KR* (2017) Central Nervous System Injury and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase: Oxidative Stress and Therapeutic Targets. *J Neurotrauma* 34(4): 755–764. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4486>
23. *Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, D WC, Harrop JS, Aarabi B, Shaffrey C, Dvorak M, Fisher C, Arnold P, Massicotte EM, Lewis S, Rumpersaud R* (2012) Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PLoS One* 7(2): e32037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032037>
24. *Xiong Y, Rabchevsky AG, Hall ED* (2007) Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem* 100(3): 639–649. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04312.x>
25. *Salim S* (2017) Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 360(1): 201–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
26. *Hellenbrand DJ, Quinn CM, Piper ZJ, Morehouse CN, Fixel JA, Hanna AS* (2021) Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration. *J Neuroinflamm* 18(1): 284. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02337-2>
27. *Garcia E, Aguilar-Cevallos J, Silva-Garcia R, Ibarra A* (2016) Cytokine and Growth Factor Activation In Vivo and In Vitro after Spinal Cord Injury. *Mediat Inflamm* 2016: 9476020. <https://doi.org/10.1155/2016/9476020>
28. *Schwartz G, Fehlings MG* (2002) Secondary injury mechanisms of spinal cord trauma: a novel therapeutic approach for the management of secondary pathophysiology with the sodium channel blocker riluzole. *Prog Brain Res* 137: 177–190. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(02\)37016-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(02)37016-x)
29. *Yuan YM, He C* (2013) The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci Bull* 29(4): 421–435. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1358-3>

30. Rooney GE, Endo T, Ameenuddin S, Chen B, Vaishya S, Gross L, Schiefer TK, Currier BL, Spinner RJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ (2009) Importance of the vasculature in cyst formation after spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 11(4): 432–437.
<https://doi.org/10.3171/2009.4.spine08784>
31. Kalpakjian CZ, Bombardier CH, Schomer K, Brown PA, Johnson KL (2009) Measuring depression in persons with spinal cord injury: a systematic review. *J Spinal Cord Med* 32(1): 6–24.
<https://doi.org/10.1080/10790268.2009.11760748>
32. Kennedy P, Garmon-Jones L (2017) Self-harm and suicide before and after spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord* 55(1): 2–7.
<https://doi.org/10.1038/sc.2016.135>
33. Maas AIR, Peul W, Thomé C (2021) Surgical decompression in acute spinal cord injury: earlier is better. *The Lancet Neurol* 20(2): 84–86.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30478-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30478-6)
34. Flynn J, Dunn L, Galea M, Callister R, Callister R, Rank M (2013) Exercise Training after Spinal Cord Injury Selectively Alters Synaptic Properties in Neurons in Adult Mouse Spinal Cord. *J Neurotrauma* 30.
<https://doi.org/10.1089/neu.2012.2714>
35. Timoszyk WK, Nessler JA, Acosta C, Roy RR, Edgerton VR, Reinkensmeyer DJ, de Leon R (2005) Hindlimb loading determines stepping quantity and quality following spinal cord transection. *Brain Res* 1050(1–2): 180189.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.041>
36. Kreydin E, Zhong H, Latack K, Ye S, Edgerton VR, Gad P (2020) Transcutaneous Electrical Spinal Cord Neuromodulator (TESCoN) Improves Symptoms of Overactive Bladder. *Front Syst Neurosci* 14: 1.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2020.00001>
37. Doherty S, Vanhoostenberghe A, Duffell L, Hamid R, Knight S (2019) A Urodynamic Comparison of Neural Targets for Transcutaneous Electrical Stimulation to Acutely Suppress Detrusor Contractions Following Spinal Cord Injury. *Front Neurosci* 13: 1360.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01360>
38. Gerasimenko Y, Sayenko D, Gad P, Kozesnik J, Moshonkina T, Grishin A, Pukhov A, Moiseev S, Gorodnichev R, Selionov V, Kozlovskaya I, Edgerton VR (2018) Electrical Spinal Stimulation, and Imagining of Lower Limb Movements to Modulate Brain-Spinal Connectomes That Control Locomotor-Like Behavior. *Front Physiol* 9: 1196.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01196>
39. Phillips AA, Squair JW, Sayenko DG, Edgerton VR, Gerasimenko Y, Krassioukov AV (2018) An Autonomic Neuroprosthesis: Noninvasive Electrical Spinal Cord Stimulation Restores Autonomic Cardiovascular Function in Individuals with Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 35(3): 446–451.
<https://doi.org/10.1089/neu.2017.5082>
40. Moraud EM, Capogrosso M, Formento E, Wenger N, DiGiovanna J, Courtine G, Micera S (2016) Mechanisms Underlying the Neuromodulation of Spinal Circuits for Correcting Gait and Balance Deficits after Spinal Cord Injury. *Neuron* 89(4): 814–828.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.009>
41. Capogrosso M, Milekovic T, Borton D, Wagner F, Moraud EM, Mignardot J-B, Buse N, Gandar J, Barraud Q, Xing D, Rey E, Duis S, Jianzhong Y, Ko WKD, Li Q, Detemple P, Denison T, Micera S, Bezaud E, Bloch J, Courtine G (2016) A brain–spine interface alleviating gait deficits after spinal cord injury in primates. *Nature* 539(7628): 284–248.
<https://doi.org/10.1038/nature20118>
42. Barra B, Conti S, Perich MG, Zhuang K, Schiavone G, Fallegger F, Galan K, James ND, Barraud Q, Delacombaz M, Kaeser M, Rouiller EM, Milekovic T, Lacour S, Bloch J, Courtine G, Capogrosso M (2022) Epidural electrical stimulation of the cervical dorsal roots restores voluntary upper limb control in paralyzed monkeys. *Nat Neurosci* 25(7): 924–934.
<https://doi.org/10.1038/s41593-022-01106-5>
43. Rushton DN (2003) Functional electrical stimulation and rehabilitation. *Med Eng Phys* 25(1): 75–78.
[https://doi.org/10.1016/s1350-4533\(02\)00040-1](https://doi.org/10.1016/s1350-4533(02)00040-1)
44. Berger M, Gray JA, Roth BL (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60: 355–366.
<https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
45. Yabut JM, Crane JD, Green AE, Keating DJ, Khan WI, Steinberg GR (2019) Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocr Rev* 40(4): 1092–1107.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00283>
46. McKinney J, Knappskog PM, Haavik J (2005) Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J Neurochem* 92(2): 311–320.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02850.x>

47. *Cai Z* (2014) Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Mol Med Rep* 9(5): 1533–1541.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2040>
48. *Dahlstroem A, Fuxe K* (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*: Suppl 232: 1–55.
49. *Dorocic IP, Fürth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlén M, Meletis K* (2014) A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron* 83: 663–678.
50. *Hornung JP* (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* 26(4): 331–343.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.10.002>
51. *Gianni G, Pasqualetti M* (2023) Wiring and Volume Transmission: An Overview of the Dual Modality for Serotonin Neurotransmission. *ACS Chem Neurosci* 14(23): 4093–4104.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00648>
52. *Hochman S, Garraway S, Machacek DW, Shay BL* (2001) 5-HT receptors and the neuromodulatory control of spinal cord function. In: *Motor Neurobiology of the Spinal Cord*. (ed) Cope TC. London. CRC Press. 47–87.
53. *Beato M, Nistri A* (1998) Serotonin-induced inhibition of locomotor rhythm of the rat isolated spinal cord is mediated by the 5-HT₁ receptor class. *Proc Biol Sci* 265(1410): 2073–2080.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0542>
54. *Perrier JF, Rasmussen HB, Jørgensen LK, Berg RW* (2017) Intense Activity of the Raphe Spinal Pathway Depresses Motor Activity via a Serotonin Dependent Mechanism. *Front Neural Circuits* 11: 111.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00111>
55. *Perrier JF, Cotel F* (2015) Serotonergic modulation of spinal motor control. *Curr Opin Neurobiol* 33: 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.12.008>
56. *Perrier JF, Rasmussen HB, Christensen RK, Petersen AV* (2013) Modulation of the intrinsic properties of motoneurons by serotonin. *Curr Pharm Des* 19(24): 4371–4384.
<https://doi.org/10.2174/13816128113199990341>
57. *Zhong G, Diaz-Rios M, Harris-Warrick RM* (2006) Intrinsic and functional differences among commissural interneurons during fictive locomotion and serotonergic modulation in the neonatal mouse. *J Neurosci* 26(24): 6509–6517.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.1410-06.2006>
58. *Ghosh M, Pearse DD* (2014) The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Front Neural Circuits* 8: 151.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00151>
59. *Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC* (2008) The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci* 9(6): 453–466.
<https://doi.org/10.1038/nrn2401>
60. *Griffiths D, Tadic SD, Schaefer W, Resnick NM* (2007) Cerebral control of the bladder in normal and urge-incontinent women. *Neuroimage* 37(1): 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.04.061>
61. *Dahlström A, Fuxe K* (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20(7): 398–399.
<https://doi.org/10.1007/bf02147990>
62. *Ahn J, Saltos T, Tom V, Hou S* (2018) Transsynaptic tracing to dissect supraspinal serotonergic input regulating the bladder reflex in rats. *Neurourol Urodyn* 37.
<https://doi.org/10.1002/nau.23762>
63. *McMahon SB, Spillane K* (1982) Brain stem influences on the parasympathetic supply to the urinary bladder of the cat. *Brain Res* 234(2): 237–249.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90865-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90865-4)
64. *Ramage AG* (2006) The role of central 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) receptors in the control of micturition. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 2 (Suppl 2): S120–S131.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706504>
65. *Cheng CL, de Groat WC* (2010) Role of 5-HT_{1A} receptors in control of lower urinary tract function in anesthetized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(3): F771–F778.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00266.2009>
66. *Ishizuka O, Gu B, Igawa Y, Nishizawa O, Pehrson R, Andersson KE* (2002) Role of supraspinal serotonin receptors for micturition in normal conscious rats. *Neurourol Urodyn* 21(3): 225–230.
<https://doi.org/10.1002/nau.10043>

67. *Lychkova AE, Pavone LM* (2013) Role of Serotonin Receptors in Regulation of Contractile Activity of Urinary Bladder in Rabbits. *Urology* 81(3): e13–e18.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.11.029>
68. *Thor KB, Katofiasc MA, Danuser H, Springer J, Schaus JM* (2002) The role of 5-HT(1A) receptors in control of lower urinary tract function in cats. *Brain Res* 946(2): 290–297.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02897-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02897-4)
69. *Hayashi Y, Jacob-Vadakot S, Dugan EA, McBride S, Olexa R, Simansky K, Murray M, Shumsky JS* (2010) 5-HT precursor loading, but not 5-HT receptor agonists, increases motor function after spinal cord contusion in adult rats. *Exp Neurol* 221(1): 68–78.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.10.003>
70. *Holmes GM, Van Meter MJ, Beattie MS, Bresnahan JC* (2005) Serotonergic fiber sprouting to external anal sphincter motoneurons after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 193(1): 29–42.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.01.002>
71. *Hawthorne AL, Hu H, Kundu B, Steinmetz MP, Wylie CJ, Deneris ES, Silver J* (2011) The unusual response of serotonergic neurons after CNS Injury: lack of axonal dieback and enhanced sprouting within the inhibitory environment of the glial scar. *J Neurosci* 31(15): 5605–5616.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.6663-10.2011>
72. *Tran AP, Sundar S, Yu M, Lang BT, Silver J* (2018) Modulation of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Sigma Increases Chondroitin Sulfate Proteoglycan Degradation through Cathepsin B Secretion to Enhance Axon Outgrowth. *J Neurosci* 38(23): 5399–5414.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3214-17.2018>
73. *Donovan SL, Mamounas LA, Andrews AM, Blue ME, McCasland JS* (2002) GAP-43 Is Critical for Normal Development of the Serotonergic Innervation in Forebrain. *Neurosci J* 22(9): 3543–3552.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-09-03543.2002>
74. *Geoffroy CG, Zheng B* (2014) Myelin-associated inhibitors in axonal growth after CNS injury. *Curr Opin Neurobiol* 27: 31–38.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.02.012>
75. *Mehta NR, Nguyen T, Bullen JW, Jr., Griffin JW, Schnaar RL* (2010) Myelin-associated glycoprotein (MAG) protects neurons from acute toxicity using a ganglioside-dependent mechanism. *ACS Chem Neurosci* 1(3): 215–222.
<https://doi.org/10.1021/cn900029p>
76. *Li S, Strittmatter SM* (2003) Delayed Systemic Nogo-66 Receptor Antagonist Promotes Recovery from Spinal Cord Injury. *Neurosci J* 23(10): 4219–4227.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-10-04219.2003>
77. *Cooke P, Janowitz H, Dougherty SE* (2022) Neuronal Redevelopment and the Regeneration of Neuromodulatory Axons in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Front Cell Neurosci* 16.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.872501>
78. *Li Y, Li L, Stephens MJ, Zenner D, Murray KC, Winship IR, Vavrek R, Baker GB, Fouad K, Bennett DJ* (2014) Synthesis, transport, and metabolism of serotonin formed from exogenously applied 5-HTP after spinal cord injury in rats. *J Neurophysiol* 111(1): 145–163.
<https://doi.org/10.1152/jn.00508.2013>
79. *Wienecke J, Ren LQ, Hultborn H, Chen M, Møller M, Zhang Y, Zhang M* (2014) Spinal cord injury enables aromatic L-amino acid decarboxylase cells to synthesize monoamines. *J Neurosci* 34(36): 11984–2000.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3838-13.2014>
80. *Miner LH, Schroeter S, Blakely RD, Sesack SR* (2000) Ultrastructural localization of the serotonin transporter in superficial and deep layers of the rat prelimbic prefrontal cortex and its spatial relationship to dopamine terminals. *J Comp Neurol* 427(2): 220–234.
[https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001113\)427:2<220::aid-cne5>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001113)427:2<220::aid-cne5>3.0.co;2-p)
81. *Hains BC, Johnson KM, McAdoo DJ, Eaton MJ, Hulsebosch CE* (2001) Engraftment of serotonergic precursors enhances locomotor function and attenuates chronic central pain behavior following spinal hemisection injury in the rat. *Exp Neurol* 171(2): 361–378.
<https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7751>
82. *Feraboli-Lohnherr D, Barthe JY, Orsal D* (1999) Serotonin-induced activation of the network for locomotion in adult spinal rats. *J Neurosci Res* 55: 87–98.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990101\)55:13.3.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990101)55:13.3.CO;2-R)
83. *Barbeau H, Rossignol S* (1987) Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res* 412(1): 84–95.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91442-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91442-9)
84. *Nozaki M, Bell JA, Vaupel DB, Martin WR* (1977) Responses of the flexor reflex to LSD, tryptamine, 5-hydroxytryptophan, methoxamine, and d-amphetamine in acute and chronic spinal rats. *Psychopharmacology (Berl)* 55(1): 13–18.
<https://doi.org/10.1007/bf00432811>

85. *Barbeau H, Rossignol S* (1990) The effects of serotonergic drugs on the locomotor pattern and on cutaneous reflexes of the adult chronic spinal cat. *Brain Res* 514(1): 55–67.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90435-e](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90435-e)
86. *Ma L, Tang J-Y, Zhou J-Y, Zhu C, Zhang X, Zhou P, Yu Q, Wang Y, Gu X-J* (2021) Fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor used clinically, improves bladder function in a mouse model of moderate spinal cord injury. *Neural Regen Res* 16(10): 2093–2098.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.308667>
87. *Ryu Y, Ogata T, Nagao M, Sawada Y, Nishimura R, Fujita N* (2021) Early escitalopram administration as a preemptive treatment strategy against spasticity after contusive spinal cord injury in rats. *Sci Rep* 11(1): 7120.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85961-5>
88. *Lima R, Monteiro S, Gomes ED, Vasconcelos NL, Assunção-Silva R, Morais M, Salgado AJ, Silva NA* (2020) Citalopram Administration Does Not Promote Function or Histological Recovery after Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci* 21(14): 5062.
<https://doi.org/10.3390/ijms21145062>
89. *Musienko P, van den Brand R, Märzendorfer O, Roy RR, Gerasimenko Y, Edgerton VR, Courtine G* (2011) Controlling specific locomotor behaviors through multidimensional monoaminergic modulation of spinal circuitries. *J Neurosci* 31(25): 9264–9278.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.5796-10.2011>
90. *Courtine G, Gerasimenko Y, van den Brand R, Yew A, Musienko P, Zhong H, Song B, Ao Y, Ichiyama RM, Lavrov I, Roy RR, Sofroniew MV, Edgerton VR* (2009) Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. *Nat Neurosci* 12(10): 1333–1342.
<https://doi.org/10.1038/nn.2401>
91. *Eaton MJ, Berrocal Y, Wolfe SQ* (2012) Potential for Cell-Transplant Therapy with Human Neuronal Precursors to Treat Neuropathic Pain in Models of PNS and CNS Injury: Comparison of hNT2.17 and hNT2.19 Cell Lines. *Pain Res Treat* 2012: 356412.
<https://doi.org/10.1155/2012/356412>
92. *Ribotta MG, Provencher J, Feraboli-Lohnherr D, Rossignol S, Privat A, Orsal D* (2000) Activation of Locomotion in Adult Chronic Spinal Rats Is Achieved by Transplantation of Embryonic Raphe Cells Reinnervating a Precise Lumbar Level. *J Neurosci* 20(13): 5144–5152.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-13-05144.2000>
93. *Gimenez y Ribotta M, Orsal D, Feraboli-Lohnherr D, Privat A* (1998) Recovery of locomotion following transplantation of monoaminergic neurons in the spinal cord of paraplegic rats. *Ann N Y Acad Sci* 860: 393–411.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09064.x>
94. *Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ* (2004) Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 473(1): 1–15.
<https://doi.org/10.1002/cne.20049>
95. *Hains BC, Johnson KM, Eaton MJ, Willis WD, Hulsebosch CE* (2003) Serotonergic neural precursor cell grafts attenuate bilateral hyperexcitability of dorsal horn neurons after spinal hemisection in rat. *Neuroscience* 116(4): 1097–1110.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00729-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00729-7)
96. *Feraboli-Lohnherr D, Orsal D, Yakovlev A, Giménez y Ribotta M, Privat A* (1997) Recovery of locomotor activity in the adult chronic spinal rat after sublesional transplantation of embryonic nervous cells: specific role of serotonergic neurons. *Exp Brain Res* 113(3): 443–454.
<https://doi.org/10.1007/pl00005597>
97. *Eaton MJ, Pearse DD, McBroom JS, Berrocal YA* (2008) The combination of human neuronal serotonergic cell implants and environmental enrichment after contusive SCI improves motor recovery over each individual strategy. *Behav Brain Res* 194(2): 236–241.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.07.001>
98. *Bayoumi AB, Ikizgul O, Karaali CN, Bozkurt S, Konya D, Toktas ZO* (2019) Antidepressants in Spine Surgery: A Systematic Review to Determine Benefits and Risks. *Asian Spine J* 13(6): 1036–1046.
<https://doi.org/10.31616/asj.2018.0237>
99. *Wei K, Glaser JJ, Deng L, Thompson CK, Stevenson IH, Wang Q, Hornby TG, Heckman CJ, Kording KP* (2014) Serotonin Affects Movement Gain Control in the Spinal Cord. *J Neurosci* 34(38): 12690–12700.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.1855-14.2014>
100. *Thompson CK, Hornby TG* (2013) Divergent modulation of clinical measures of volitional and reflexive motor behaviors following serotonergic medications in human incomplete spinal cord injury. *J Neurotrauma* 30(6): 498–502.
<https://doi.org/10.1089/neu.2012.2515>

101. *Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R* (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24): 14476–14481.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14476>
102. *Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH* (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 15049–15054.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15049>
103. *Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M* (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin 1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10734–10739.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10734>
104. *Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R* (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301(5634): 805–809.
<https://doi.org/10.1126/science.1083328>
105. *Rusanescu G, Mao J* (2015) Immature spinal cord neurons are dynamic regulators of adult nociceptive sensitivity. *J Cell Mol Med* 19(10): 2352–2364.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12648>
106. *Havelikova K, Smejkalova B, Jendelova P* (2022) Neurogenesis as a Tool for Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci* 23(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms23073728>
107. *Rodríguez-Barrera R, Rivas-González M, García-Sánchez J, Mojica-Torres D, Ibarra A* (2021) Neurogenesis after Spinal Cord Injury: State of the Art. *Cells* 10(6): 1499.
108. *Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, Saito M, Kohno K, Kohyama J, Namihira M, Komiya S, Nakashima K* (2010) Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest* 120(9): 3255–3266.
<https://doi.org/10.1172/jci42957>
109. *Lukovic D, Moreno-Manzano V, Lopez-Mocholi E, Rodríguez-Jiménez FJ, Jendelova P, Sykova E, Oria M, Stojkovic M, Erceg S* (2015) Complete rat spinal cord transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation. *Sci Rep* 5: 9640.
<https://doi.org/10.1038/srep09640>
110. *Zaniewska M, Mosienko V, Bader M, Alenina N* (2022) Tph2 Gene Expression Defines Ethanol Drinking Behavior in Mice. *Cells* 11(5).
<https://doi.org/10.3390/cells11050874>
111. *Kulikova EA, Kulikov AV* (2019) Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models. *Expert Opin Ther Targets* 23(8): 655–667.
<https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1634691>
112. *Kjell J, Olson L* (2016) Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Disease Models & Mechanisms* 9(10): 1125–1137.
<https://doi.org/10.1242/dmm.025833>
113. *Onifer SM, Nunn CD, Decker JA, Payne BN, Wagoner MR, Puckett AH, Massey JM, Armstrong J, Kaddumi EG, Fentress KG, Wells MJ, West RM, Calloway CC, Schnell JT, Whitaker CM, Burke DA, Hubscher CH* (2007) Loss and spontaneous recovery of forelimb evoked potentials in both the adult rat cuneate nucleus and somatosensory cortex following contusive cervical spinal cord injury. *Exp Neurol* 207(2): 238–247.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.012>
114. *Minakov AN, Chernov AS, Asutin DS, Konovalov NA, Telegin GB* (2018) Experimental Models of Spinal Cord Injury in Laboratory Rats. *Acta Naturae* 10(3): 4–10.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-3-4-10>
115. *Kaplan K, Echert AE, Massat B, Puissant MM, Palygin O, Geurts AM, Hodges MR* (2016) Chronic central serotonin depletion attenuates ventilation and body temperature in young but not adult Tph2 knockout rats. *J Appl Physiol* (1985) 120(9): 1070–1081.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01015.2015>
116. *Sidorova M, Kronenberg G, Matthes S, Petermann M, Hellweg R, Tuchina O, Bader M, Alenina N, Klempin F* (2021) Enduring Effects of Conditional Brain Serotonin Knockdown, Followed by Recovery, on Adult Rat Neurogenesis and Behavior. *Cells* 10(11).
<https://doi.org/10.3390/cells10113240>
117. *Meng X, Grandjean J, Sbrini G, Schipper P, Hofwijks N, Stoop J, Calabrese F, Homberg J* (2022) Tryptophan Hydroxylase 2 Knockout Male Rats Exhibit a Strengthened Oxytocin System, Are Aggressive, and Are Less Anxious. *ACS Chem Neurosci* 13(20): 2974–2981.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00448>

The Role of the Serotonergic System in Functional Recovery after Spinal Cord Injury

**S. P. Konovalova^a, Y. I. Sysoev^{a, b, c}, A. Vetlugina^a, K. A Arsentiev^a,
and P. E. Musienko^{a, d, e, *}**

^aDepartment of Neurobiology, Scientific Center of Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory of Sirius, Russia

^bPavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^cInstitute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^dLife Improvement by Future Technologies Center "LIFT", Moscow, Russia

^eFederal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia

**e-mail: musienko.pe@talantiuspeh.ru*

The serotonergic system plays an essential role in the modulation of the spinal networks activity involved in the control of motor, sensory, and visceral functions. Spinal cord injury (SCI) can induce a state of overexcitation that contributes to pain, spasticity, and dysregulation of autonomic functions. At the same time, 5-NT axons are known to adapt faster than others to pathophysiologic changes and leave the ability to sprout and regenerate after injury. A number of experimental animal studies as well as some clinical observations suggest that the serotonergic system is a key endogenous resource for posttraumatic recovery after SCI. Specific therapy may include administration of serotonergic drugs and intraspinal transplantation of 5-NT neurons. This review discusses the role of the serotonergic system in functional recovery after SCI and the prospects for the use of serotonergic drugs in neurorehabilitation.

Keywords: spinal cord injury, serotonin, neuroregeneration, functional recovery, motor disorders, visceral dysfunction, neurogenesis, TPH2-KO

ОБЗОРЫ

**ПРОЕКЦИОННЫЕ НЕЙРОНЫ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ,
ИХ УЧАСТИЕ В ФОРМИРОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ПОВЕДЕНИЯ
И ЭКСПРЕССИЯ В НИХ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА**

© 2024 г. У. С. Дрозд¹, Я. А. Фрик^{1,2}, А. В. Смагин¹, Д. А. Ланшаков^{1,2,3,*}

¹Институт цитологии и генетики РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: lanshakov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 17.07.2024 г.

После доработки 04.09.2024 г.

Принята к публикации 20.09.2024 г.

Префронтальная кора (PFC) играет ключевую роль в когнитивной пластичности и участвует в различных процессах высшей нервной деятельности. В то же время изучение процессов, лежащих в основе разных форм поведения, в которых принимают участие нейроны PFC, является нетривиальной задачей. Ассоциативные функции PFC связывают с характером коннективности этой структуры с другими областями головного мозга, которая по последним данным оказывается гораздо сложнее, чем это считалось ранее. Так, становится ясно, что аксоны проекционных нейронов PFC имеют множество коллатералей, проецирующихся на большое число разнообразных мишеней в головном мозге. В данном обзоре мы осветили последние результаты изучения коннективности нейронов PFC с использованием новейших методов анализа проекций и транскриптомов единичных клеток. Нейротрофический фактор мозга (BDNF) играет важную роль в функционировании этих нейронов и их проекционных мишеней, но особенно важным может быть транспорт этого нейротрофина проекционными нейронами PFC в те структуры, где не происходит его местной экспрессии. Мы рассмотрели последние результаты по картированию таких нейронов в PFC, осветили экспрессию *Bdnf* и его потенциальную роль в патогенезе психических заболеваний.

Ключевые слова: префронтальная кора, проекционные нейроны, коннективность, нейротрофический фактор мозга

DOI: 10.31857/S0869813924090039, **EDN:** AKGJXD

ВВЕДЕНИЕ

Префронтальная кора (PFC) участвует в большом разнообразии процессов высшей нервной деятельности, например, в условно-рефлекторном обучении [1], формировании, консолидации и воспроизведении памяти [2], социальном поведении [3], принятии решений [4]. В обработке информации, обуславливающей эти процессы, принимают участие миллионы нейронов по всему мозгу, однако широко признано, что именно PFC является критическим центром, обладающим ассоциативными функциями. Именно с этой структурой головного мозга связаны высшие исполни-

тельные функции, т. е. функции, позволяющие совершать и планировать высокоуровневые задачи и процессы, достигшие беспрецедентной сложности у людей. Многие нейropsychологи указывают на связь функций PFC с личностью человека, его желанием жить. Нарушения в работе нейронов PFC чаще всего связывают с такими психическими заболеваниями как депрессия, тревожность и шизофрения [5–8]. Также они могут участвовать в патогенезе детских нейропатологий, например, расстройства аутистического спектра (РАС) [9, 10] и синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) [11]. Однако даже после десятилетий исследований механизмы патогенеза этих заболеваний все еще не вполне ясны. Также остается загадкой, каким образом высшие когнитивные способности возникают в результате активности нейронов PFC. Одной из ключевых сложностей на пути к пониманию этих процессов является невозможность исследовать нейронные сети головного мозга человека на таком же уровне, как у животных ввиду этических и технических ограничений. В то же время эволюционно возникшие различия в размере и строении головного мозга между разными видами млекопитающих особенно заметны в PFC: у людей эта структура самая большая, она составляет треть всей коры больших полушарий и содержит почти в 2 раза больше нейронов, чем у макак [12]. Это подчеркивает сложность задачи экстраполяции результатов, полученных на животных моделях. Тем не менее в последнее время появляется все больше данных, позволяющих установить функциональную гомологию областей и кластеров нейронов PFC у модельных видов животных и у человека.

Даже если не учитывать проблематику межвидовых различий, исследование механизмов, посредством которых PFC осуществляет ассоциативные функции, затруднено ввиду особенностей функциональной организации этой структуры. Большая часть наших текущих знаний о роли PFC в когнитивном контроле получена из модульной парадигмы, согласно которой определенные функции приписывались отдельным областям PFC с исходным предположением, что они действуют как независимые процессоры для конкретных когнитивных функций [13]. Однако сейчас эта парадигма трансформируется в представление о том, что функции PFC следует рассматривать в контексте взаимосвязи разнообразных нейронов, распределенных в PFC, между собой и другими областями мозга, и именно этим нужно руководствоваться при исследовании роли PFC в когнитивном контроле. Для осуществления обработки информации в PFC безусловно важны все участники процесса: локальные интернейроны, составляющие около 17% от числа всех нейронов в PFC у мышей, и пирамидные клетки, имеющие проекции как в пределах одной области, так и в других областях коры и в подкорковых структурах (примерно 82%) [14]. Однако среди них именно аксоны проекционных нейронов могут рассматриваться как анатомическая связь между PFC и другими областями мозга, обуславливающая ассоциативные функции. Впрочем, вопрос о коннективности отдельных нейронов PFC остается не до конца изученным. До последнего времени теории, объясняющие функции PFC исходя из ее коннективности с другими областями мозга, постулировали, что каждый отдельно взятый нейрон PFC преимущественно проецируется на одну мишень [15]. В недавних исследованиях по анализу ветвления аксонов единичных нейронов PFC было показано, что они, напротив, могут иметь множество коллатералей, причем с проекциями в разные отделы головного мозга [16]. Таким образом, можно утверждать, что ассоциативная роль PFC в многочисленных когнитивных процессах обеспечивается как ее анатомическим и цитоархитектоническим строением, так и характером образуемых ее отростками связей с другими областями мозга. Понимание организации этих связей необходимо для дальнейшего изучения функций PFC и разработки возможных методов коррекции состояний, вызванных их нарушением.

Немаловажную роль в развитии и функционировании проекционных нейронов PFC для принимает нейротрофический фактор мозга – BDNF. Этот нейротрофин широко

экспрессируется в ЦНС и других тканях [17], но особенно интересен тот факт, что в коре больших полушарий BDNF экспрессируется только в возбуждающих глутаматергических нейронах [18]. При этом трансиноптическая передача BDNF необходима для правильного развития и функционирования дофаминергических, ГАМКергических, холинергических и серотонинергических нейронов, являющихся проекциями экспрессирующих BDNF нейронов [19]. Снижение экспрессии BDNF в PFC наблюдается при депрессии [20], и многие антидепрессанты, включая не только действующие на моноаминергические системы [21], но также и антагонисты NMDA-рецепторов [22], и соли лития [23, 24] восстанавливают экспрессию BDNF в PFC. Эти данные указывают на то, что BDNF играет важную роль в процессах, осуществляемых нейронными сетями, образуемыми при участии проекционных нейронов PFC.

В этом обзоре мы рассмотрели последние достижения в области изучения коннективности проекционных нейронов PFC и, в частности, BDNF экспрессирующих нейронов. Учитывая важность роли BDNF в развитии и функционировании нейронов и их проекционных мишеней, мы также обсудили регуляцию экспрессии BDNF и возможности его использования в терапии заболеваний нервной системы.

ПРЕФРОНТАЛЬНАЯ КОРА И ЕЕ ПРОЕКЦИОННЫЕ НЕЙРОНЫ

PFC представляет собой весьма гетерогенную структуру мозга, состоящую из анатомических единиц, каждая из которых обладает собственными цитоархитектоническими, нейрохимическими и микроструктурными свойствами [25]. У приматов PFC можно условно разделить на области, включающие дорсолатеральную PFC (dlPFC), вентролатеральную PFC (vlPFC), ростральные части орбитофронтальной коры (OFC) и лобный полюс или поле 10 (FP) (рис. 1). Кроме того, в PFC часто включают также каудальную OFC и переднюю поясную извилину (ACA), несмотря на то, что по цитоархитектоническим критериям (наличие четкого зернистого слоя) их технически нельзя отнести к PFC. Каждая область PFC по своей архитектонике делится на определенные поля коры по Бродману: dlPFC – поля 9, 46 и 9/46; vlPFC – поля 44, 45 и 47/12; ACA – поля 24, 25 и 32 и OFC – поля 11, 13 и 14 [26]. В свою очередь, у грызунов PFC делится на латеральную область, орбитофронтальную кору (OFC) и медиальную область, называемую медиальной префронтальной корой (mPFC). mPFC можно подразделить на ACA, прелимбическую кору (PL), инфралимбическую кору (IL) и медиальную OFC [27]. Также в последние годы некоторые исследователи стали включать в PFC вторичную моторную область (M2) [28] (рис. 1a – c). В то же время эти области коры у грызунов являются агранулярными (то есть не содержат ярко выраженного 4-го слоя), из-за чего установить их гомологию с областями приматов затруднительно. Сопоставление проекций, образуемых PFC к другим областям мозга, является одним из подходов к определению гомологичных областей у разных видов млекопитающих. Функция конкретной области PFC зависит как от ее внутренних свойств, так и от внешних связей. Каждая область PFC имеет уникальные корково-корковые и кортико-подкорковые связи, которые отличают ее от других областей [29]. Несмотря на то, что вопрос еще изучен не в полной мере, представляется, что PFC грызунов содержит области-гомологи агранулярной медиальной лобной (области 24, 32 и 25) и агранулярной OFC приматов, но не имеет гомологов зернистой коры, которая составляет большую часть PFC у большинства видов приматов [30]. Тем не менее грызуны являются важными биомедицинскими модельными объектами, а области PFC, общие для грызунов и приматов, а именно лимбическая часть, в некоторых отношениях имеют даже большее клиническое значение, чем гранулярная PFC. Таким образом, интерес к подробному исследованию проекций нейронов PFC у грызунов оправдан также и возможностью сопоставления структурной основы для понимания разнообразных когнитивных функций PFC и экстраполяции результатов.

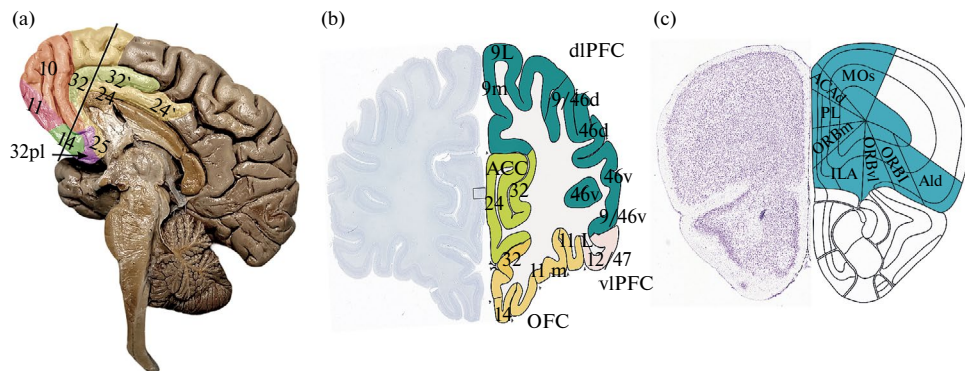


Рис. 1. Анатомия префронтальной коры (PFC) приматов и грызунов. (a) – мозг человека, вид с медиальной плоскости, цветом отмечены поля Бродмана, входящие в PFC, линией отмечен примерный уровень среза на рис. 1b (препарат анатомического музея Факультета естественных наук Новосибирского государственного университета); (b) – фронтальный срез мозга человека (Allen Reference Atlas – Human Brain, atlas.brain-map.org [96]) и анатомическая схема названия областей и полей Бродмана, входящих в PFC; (c) – коронарный срез мозга мыши: окраска по Нисслю и подразделение PFC на основные анатомические зоны (Allen Reference Atlas – Mouse Brain, atlas.brain-map.org [97]).

Учитывая, что PFC имеет проекции в нескольких областях головного мозга, проецируется ли каждый отдельно взятый нейрон в одну область мозга или в несколько областей, является фундаментальным вопросом. Для решения этого вопроса технология ретроградной трассировки применялась во многих исследованиях. Одному животному в две мишени проекций PFC вводятся вирусные векторы, которые ретроградным аксональным транспортом проникают в проецирующие нейроны и экспрессируют там флуоресцентные белки. Затем подсчитывается количество нейронов PFC, помеченных обоими трассерами, то есть проецирующихся в обе области. Исследования с использованием этого подхода на крысах и мышах продемонстрировали, что количество отдельных нейронов PFC, проецирующихся в две области мозга, весьма невелико [3, 30–33]. Хотя эти результаты, по-видимому, предоставляют веские доказательства того, что нейроны PFC преимущественно проецируются в одну из двух областей, куда вводили трассеры, в то же время множество других проекционных областей могут оставаться неучтенными. Действительно, анализ объемных аксональных проекций ретроградно маркированных нейронов показывает, что они также проецируются в области, отличные от тех, в которые вводится трассер [31].

Однако полная оценка всех проекций требует трассировки аксонов и аксональных коллатералей отдельных нейронов PFC. Хотя ранее это было трудоемкой задачей, достижения в области визуализации и вычислительных методов теперь сделали решение данной проблемы осуществимым в больших масштабах. Так, технология light sheet [34] позволяет быстро получать конфокальные изображения целых органов, таких как мозг мыши с большим разрешением, до уровня отдельных отростков нейронов. Это позволило стартовать мега-проектам по изучению коннективности нейронов мозга в Allen Brain Institute [35] и Университете науки и технологий в Гуанчжоу [36]. В настоящее время возможно анализировать связи единичных нейронов в отдельных структурах. Так, в недавнем исследовании Le Gao с соавт. [16] с использованием метода флуоресцентной микро-оптической секционной томографии (fMOST, рис. 2) был создан атлас, в котором детально проанализированы и классифицированы проекции единичных нейронов PFC мыши. Суть метода fMOST состоит в получении широкополных

изображений мозга в нескольких каналах флуоресценции с разрешением на уровне клеток и аксонов и идентификацией анатомических реперных точек для наложения перекрывающихся изображений (рис. 2). Таким образом создается 3D изображение мозга, позволяющее разглядеть отдельные клетки и пути следования их отростков. По полученным изображениям при помощи специально разработанного математического аппарата строится 3D компьютерная модель ветвления флуоресцирующих отростков клеток, и для каждого единичного нейрона анализируется, куда направляются терминали, порядок и степень их ветвления.

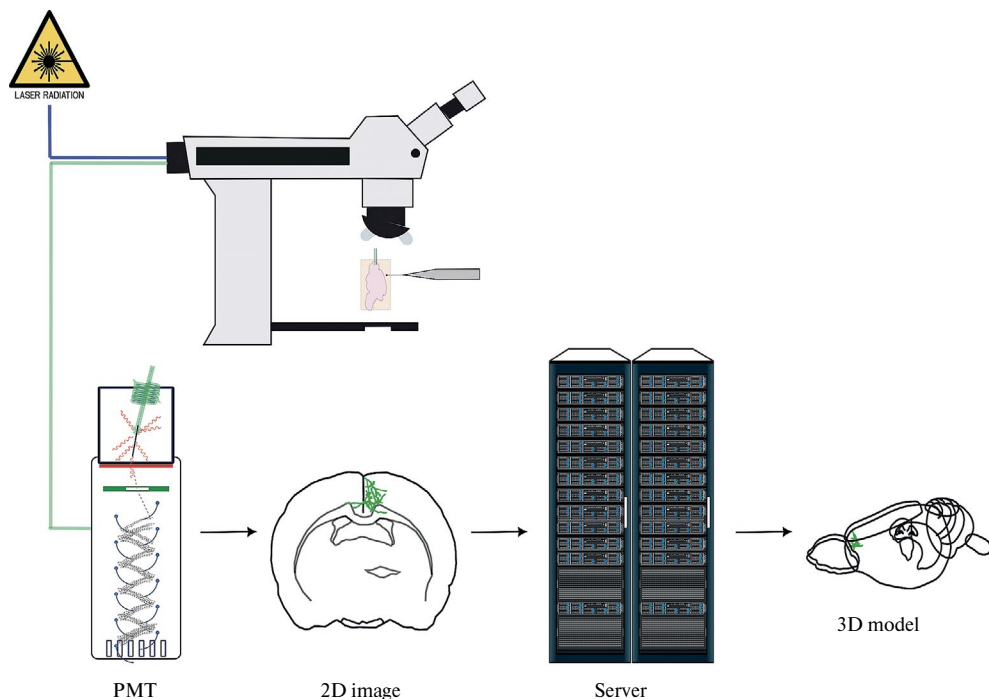


Рис. 2. Схема, отображающая получение трехмерной компьютерной модели ветвления единичных нейронов при помощи флуоресцентной микрооптической секционной томографии (fMOST). PMT – детектирующий фотоумножитель.

На основе этих данных было выделено 64 типа проекционных нейронов. В PFC, если рассмотреть терминалы нейронов только по первому порядку ветвления, т.е. первому направлению аксона, все нейроны можно разделить на интрателенцефалические (ИТ, 1–44 типа), корково-таламические (СТ, 45–52 типа) и нейроны, аксоны которых образуют пирамидный тракт (РТ, 53–64 типа). Схематическое изображение расположения разных типов проекционных нейронов в PFC представлено на рис. 3б.

При анализе изображений атласа можно заключить, что во всех областях PFC присутствуют нейроны каждого из трех больших классов. Большинство (38 из 64) подтипов нейронов являются специфичными для областей PFC или охватывают только 2–5 областей PFC. Но некоторые подтипы нейронов присутствуют почти во всей PFC. При этом ИТ-нейроны широко представлены от 2/3 до 6 слоев коры, РТ – в 5-м слое, а СТ – в 5-м и 6-м слоях. Интересно, что расположение тел нейронов топографически соответствует проекциям их

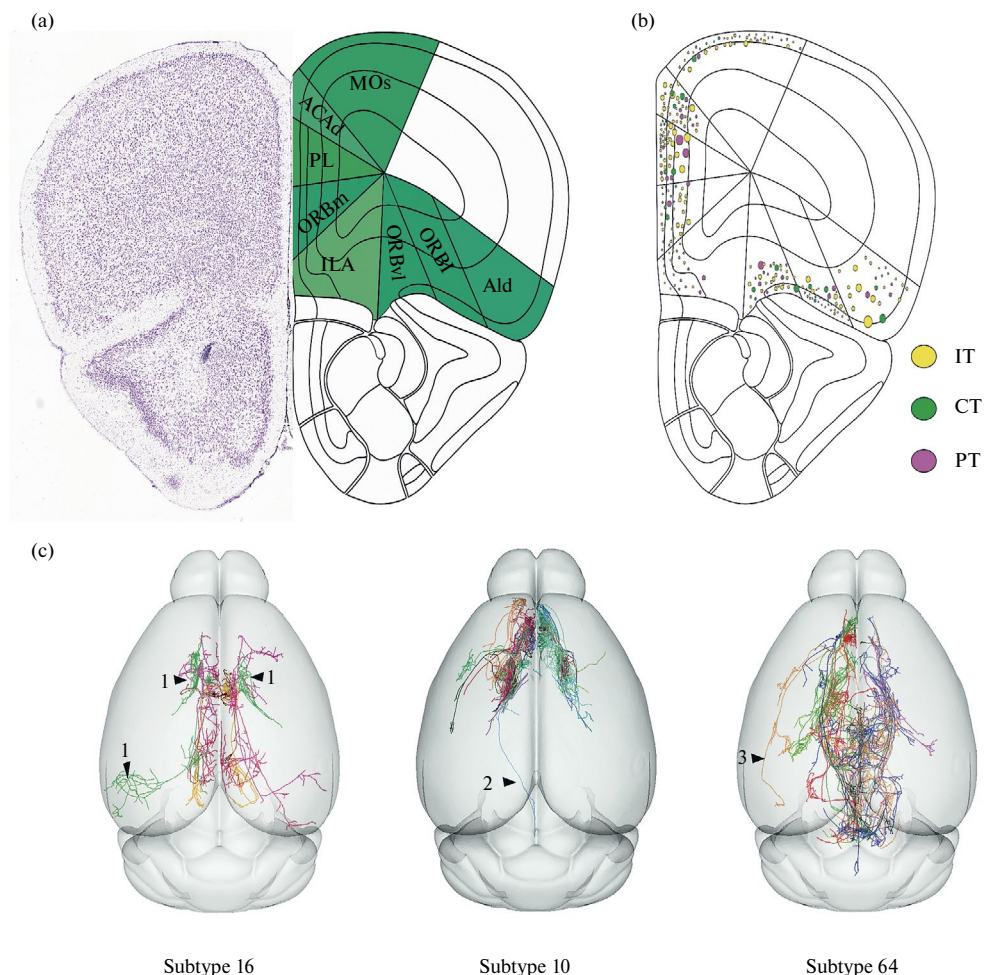


Рис. 3. Проекционные нейроны префронтальной коры. (a) – окраска по Нисслию и подразделение PFC на основные анатомические зоны (Allen Reference Atlas – Mouse Brain, atlas.brain-map.org [97]); (b) – расположение проекционных нейронов PFC по данным Gao с соавт. [16] (<https://mouse.braindatacenter.cn/>). Размер кругов пропорционально соответствует числу нейронов каждого подтипа в пределах анатомической зоны; (c) – представлены некоторые типы проекционных нейронов. Видны коллатерали IT-нейронов 10-го типа (отмечены стрелками и цифрой 1), субкортикальная коллатераль IT-нейрона 16-го типа (отмечена стрелкой и цифрой 2) и кортикальная коллатераль PT-нейрона 64-го типа (отмечена стрелкой и цифрой 3). Отдельные нейроны обозначены разными цветами [16], (<https://mouse.braindatacenter.cn/>).

аксонов, однако является не единственным фактором, определяющим распределение их мишеней. Кроме того, подтипы проекционных нейронов различаются по длине и типу ветвления аксонов. Так, IT-нейроны иннервируют несколько областей коры коллатералими второго и третьего порядков, причем эти коллатерали могут иннервировать как области в том же полушарии, так и в противоположном, а также в совершенно другой области коры (рис. 3, 5). Например, основная проекция нейрона расположена в зрительной коре, но по пути аксон отдает коллатераль в слуховую кору на ипсилатеральную и контралатеральную стороны (рис. 3с, 5). У разных подтипов IT-нейронов проекции коллатералей зна-

чительно отличаются. Такое распределение коллатералей указывает на то, что один и тот же IT-нейрон может участвовать в функциональной координации нескольких областей коры. Примечательно, что IT-нейроны также отдают коллатерали субкортикально (рис. 5). Так, они обширно связаны с базолатеральной миндалиной (BLA) – структурой, связанной с реакцией страха [37], дорзальным стриатумом, связанным с оперантным ответом [38], вентральным стриатумом – с социальным [39] и вариативным поведением [40], клауструм – с контролем действий [41] и паллидумом – с положительным подкреплением [38].

Для подтипов РТ-нейронов также характерно соответствие расположения тела в конкретной области PFC и проекционной структуры. Например, среди четырех подтипов РТ, преимущественно локализованных в передней поясной извилине (ACA), один подтип иннервирует верхние бугры четверохолмия, которые связаны с моторикой (SCm), а другой – центральное серое вещество (PCG), причем тела этих двух подтипов нейронов расположены на задней и передней частях ACA соответственно. При этом коллатерали первого порядка аксонов РТ-нейронов иннервируют ближайшую от места ветвления подкорковую мишень. Например, один и тот же кластер коллатералей проецируется на вентральную область покрышки (VTA) и компактную и ретикулярную части черной субстанции (SNc/SNr) по пути следования первичных аксонов РТ-нейронов [16]. Это может быть структурной основой регуляции PFC дофаминергических нейронов в VTA и SNc при ассоциативном обучении [16].

Тела восьми подтипов СТ-нейронов также пространственно разделены внутри PFC. Первичные аксоны СТ тракта имеют медиолатеральный порядок, такой же, как расположение тел в PFC, который превращается в переднезадний порядок, когда аксональный тракт СТ резко поворачивается перед достижением таламуса. Этот переднезадний порядок аксонов СТ определяет порядок их терминального распределения в таламусе. Помимо таламических ядер, некоторые СТ-нейроны (например, подтипы 45 и 52) также проецируются в другие подкорковые области, включая клауструм (CLA), наружный и внутренний сегменты бледного шара (GPe/GPi), безымянную субстанцию (SI), ядро ложа конечной полоски (BST), неопределенную зону (ZI) и латеральную область гипоталамуса (LHA) [16].

Интересно, что PFC, в отличие от других областей коры, имеет сильные проекции на все основные группы мезопонтичных моноаминергических и холинергических клеток, а не только иннервируется ими, и значит имеет с ними реципрокные связи. Причем разные области PFC оказывают разный модулирующий эффект. Например, mPFC в основном возбуждает дофаминовые нейроны VTA, а OFC ингибирует их [42]. Более того, как выяснилось в ходе изящного электронно-микроскопического исследования, аксоны PFC преимущественно контактируют с дофаминовыми нейронами VTA, которые проецируются обратно в mPFC [43]. Учитывая, что отдельные клетки mPFC могут отправлять коллатерали как в VTA, так и в дорсальное ядро шва (DRN) [44], это означает, что PFC способна не только регулировать дофаминовый сигналинг от VTA, но и одновременно влиять на другие модулирующие группы клеток среднего мозга [45]. Именно обширные коллатерали проекционных нейронов PFC позволяют ей выполнять ассоциативную функцию, участвовать и координировать множество сложных когнитивных процессов.

ТРАНСКРИПТОМИКА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК PFC

В молекулярной биологии также наблюдается прорыв с использованием технологии изучения транскриптомики единичных клеток (рис. 4).

Результаты исследования транскриптомов единичных клеток PFC [16, 46, 47] позволили идентифицировать несколько основных генов маркеров проекционных нейронов, экспрессирующихся в PFC, но они присутствуют во всех трех типах IT-, СТ-, РТ-нейронов, в зависимости от области PFC (рис. 5a). *Lypd1* и *Penk* являются маркерами IT-нейронов 2–3-х слоев; *Rorb*, *Deptor* и *Nnat* – маркеры IT-нейронов 5–6-х слоев; *Npnt* и *Lypd1* – РТ-нейронов, а *Nnat* и *Tbpg* – СТ-нейронов. Примечательно, что наблюдается как распределение экспрессии этих маркеров по слоям коры (от верхних до нижних), например, во

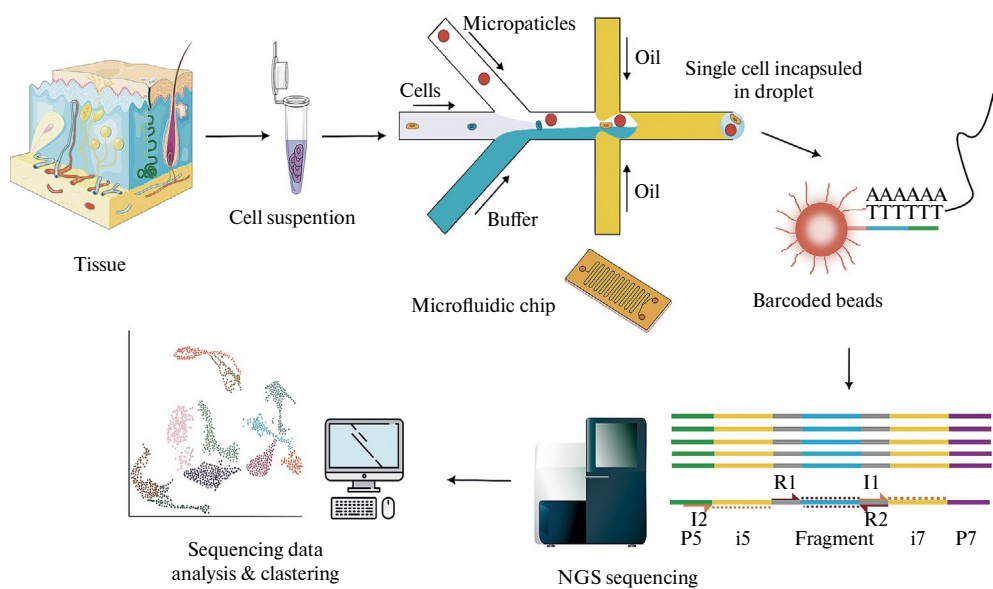


Рис. 4. Схема, отображающая принципы транскриптомики единичных клеток. Ткань разбивают на клетки, после чего в микрофлюидном чипе объединяют с баркодированными бусинами в несмешивающуюся эмульсию. Обратную транскрипцию проводят по механизму переключения матрицы с целью включения заданных последовательностей по концам. После этого проводят массовое параллельное секвенирование NGS, компьютерную обработку и кластеризацию.

вторичных моторных областях (МО), так и медиально-латерально по областям PFC от PL до ORB. *Lypd1*⁺ IT-нейроны 2/3-х слоев и *Nnat*⁺ IT-нейроны 5/6-х слоев чаще встречаются в прелимбической (PL), орбитомедиальной (ORBm) областях, а *Lypd1*⁺ PT и *Nnat*⁺ СТ-нейроны встречаются в вентролатеральной (ORBvl) и латеральной орбито-фронтальной (ORBf) областях. IT-нейроны, проецирующие коллатерали в вентральный стриатум (тип 21 и 38), больше экспрессируют *Nnat*, в то время как проецирующие в дорзальный стриатум (тип 26) – *Deptor* (рис. 5b). СТ-нейроны, проецирующие в субмедиальное ядро (SMT), экспрессируют *Tbpq* (тип 47 and 50), а PT-нейроны, проецирующие в область верхних бугров четверохолмия (тип 53 and 55) – *Npnt* (рис. 5b, табл. 1). У разных подтипов проекционных нейронов в области PL/ORB обнаруживается разный паттерн экспрессии этих генов, что может свидетельствовать о том, что различия в ветвлении аксонов могут иметь молекулярно-генетическую основу, вероятно, заложенную во время раннего развития.

Таблица 1. Сравнение экспрессии выделенных маркерных генов по слоям PFC по данным Gao с соавт. [16]

Области PFC	<i>Lypd1</i> ⁺ IT 2/3-х слоев	<i>Penk</i> ⁺ IT 2/3-х слоев	<i>Rorb</i> ⁺ IT 5/6-х слоев	<i>Deptor</i> ⁺ IT 5/6-х слоев	<i>Nnat</i> ⁺ IT 5/6-х слоев	<i>Tbpq</i> ⁺ СТ	<i>Nnat</i> ⁺ СТ	<i>Npnt</i> ⁺ PT	<i>Lypd1</i> ⁺ PT
PL–ILA–ORB	+	+	+++	+++	+++	++	++	++	+
ACC	+	+	+++	+++	+++	++	++	+	+
AI	+	+	++	++	+++	++	++	+	+
MOs	+	+	+++	++	++	+	+	-	-

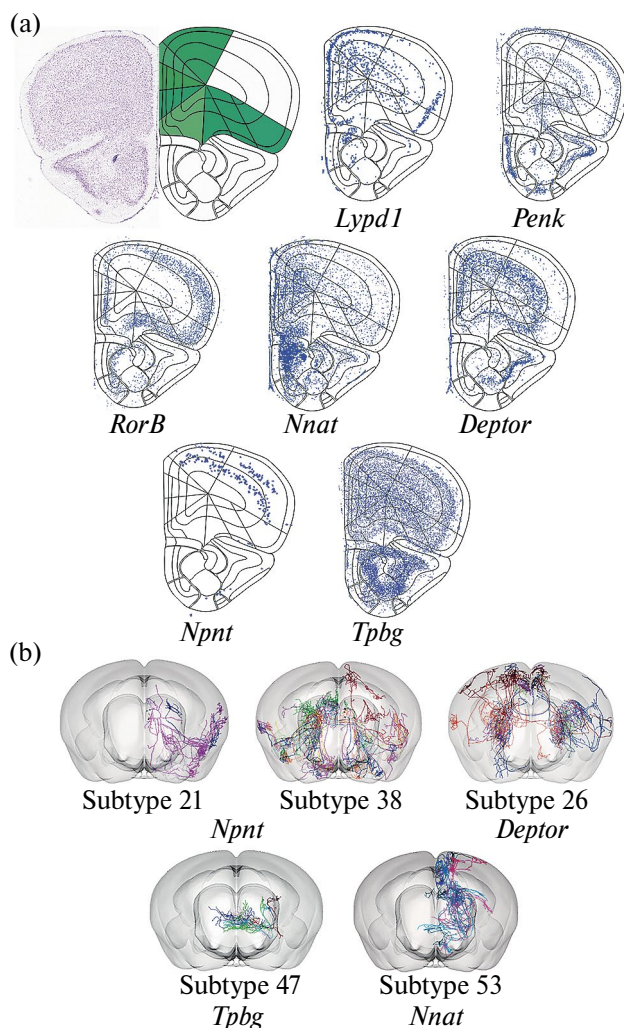


Рис. 5. Экспрессия основных генов маркеров. (a) – экспрессия основных маркерных генов в PFC по данным транскриптомики единичных клеток (данные *in situ* гибридизации взяты из Allen Mouse Brain Atlas, mouse. brain-map.org [98]); (b) – приведены некоторые типы проекционных нейронов и маркеры, которые экспрессируются преимущественно в них. Отдельные нейроны обозначены разными цветами. По данным Gao с соавт. [16].

ПРОЕКЦИОННЫЕ НЕЙРОНЫ PFC, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР МОЗГА

BDNF участвует в широком спектре функций мозга, включая дифференцировку нейронов и рост нейритов во время развития, а также структуру и пластичность синапсов на протяжении развития и взрослой жизни [48, 49]. BDNF также имеет решающее значение для различных форм обучения и памяти [50, 51] и участвует в патогенезе ряда психических расстройств, включая депрессию, зависимость и обсессивно-компульсивное расстройство [19], а также шизофрению [8]. BDNF экспрессируется довольно

широко в головном мозге: в VTA, миндалине, гиппокампе и PFC [52]. Примечательно, что в дорсальном стриатуме (DS) и прилежащем ядре (NAc) BDNF практически не экспрессируется, а преимущественно поставляется за счет anterogradного аксонального транспорта от пирамидных нейронов PFC с незначительным вкладом от дофаминергических нейронов VTA [53]. В недавнем исследовании Ehinger с соавт. [54] выявили источники BDNF экспрессирующих проекций в DS. В своих исследованиях они использовали трансгенных мышей, экспрессирующих Cre-рекомбиназу под промотором *Bdnf*. Животным в различные части стриатума вводили ретроградные трассеры – частицы AAV, проникающие в нейроны ретроградно благодаря специально отобранному капсиду. В вирусном генетическом материале была закодирована репортерная конструкция, запускающаяся только после рекомбинации (рис. 6b, c). Таким образом обнаружилось, что нейроны mPFC, экспрессирующие BDNF, в основном дают проекции в дорсомедиальный стриатум (DMS), в то время как BDNF нейроны из первичной и вторичной моторной (M1 и M2) и агранулярной инсुлярной коры (AI) проецируются в основном в дорсолатеральный стриатум (DLS) [54]. Важность BDNF-сигналинга в этих нейронных сетях уже была показана. Потребление алкоголя вызывает изменения в глутаматергических синапсах в проекциях из AI в DLS [55], причем BDNF нужен для этой синаптической адаптации [56], а в сети MO-DLS BDNF необходим для моторного обучения [57]. В то же время DMS играет важную роль в целенаправленном поведении [58], а BDNF в MO необходим для поддержания целенаправленного действия у мышей. В частности, Gourley с соавт. показали, что нокдаун BDNF в MO снижает поведенческую чувствительность к девальвации подкрепления [59]. Таким образом, вполне вероятно, что BDNF, высвобождаемый MO-нейронами в DMS, регулирует контроль

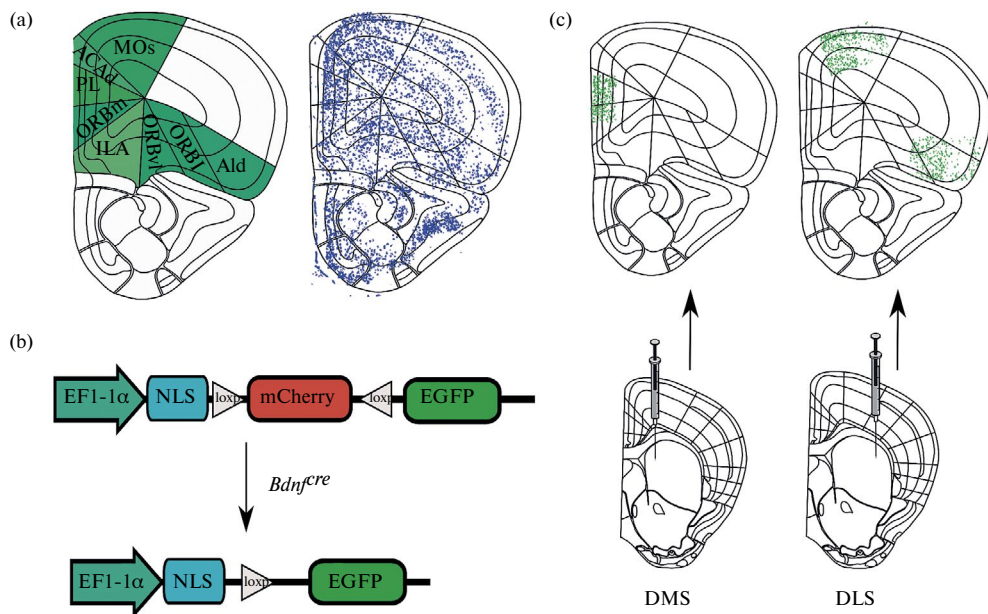


Рис. 6. Проекционные нейроны PFC, экспрессирующие нейротрофический фактор мозга *Bdnf*. (a) – экспрессия *Bdnf* в PFC. Приведены данные *in situ* гибридизации из Allen Mouse Brain Atlas, mouse.brain-map.org [98]. (b) – репортерная конструкция, которая вводилась Ehinger с соавт. *Bdnf^{cre}* мыши в виде аденоассоциированных вирусов с капсидом, транслирующим нейроны ретроградно (ретроградных трассеров) в разные области стриатума. (c) – экспрессирующие BDNF нейроны PFC, проецирующиеся в разные области стриатума, выявленные при помощи введения ретроградных трассеров в дорсомедиальный (DMS) и дорсолатеральный (DLS) стриатум [54].

целенаправленного поведения. Другая возможная роль BDNF в этом кортикостриарном контуре заключается в формировании и модуляции синапсов нейронов стриатума.

Проекции из PL в NAc имеют критическое значение для терапевтического эффекта BDNF при употреблении кокаина, что было показано при помощи хомогенетического подхода с Сте-зависимой ретроградной экспрессией [60]. Ранее эти же исследователи уже продемонстрировали, что введение BDNF в PL нормализует вызванное кокаином снижение внеклеточного глутамата в NAc [61]. При этом подавление активности проекций PL в паравентрикулярное ядро таламуса вызывает такой же эффект и в отсутствие BDNF. Это в очередной раз подчеркивает многогранность функций, которые выполняет PFC или отдельные ее области, что может быть связано как с характером распространения аксонов и их терминалей, так и молекулярными механизмами, которые могут отличаться в разных популяциях нейронов в пределах одной области. Представленные выше данные указывают на то, что в сетях, образуемых при участии проекционных нейронов PFC, BDNF играет важную роль, связанную, видимо, с его функцией регуляции нейропластичности [62]. Тем не менее обширные коллатерали экспрессирующих BDNF нейронов PFC не были учтены в этих работах и могут быть предметом будущих исследований.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *BDNF*

Bdnf – ген с очень сложной транскрипционной и трансляционной регуляцией и посттрансляционным процессингом [63–67]. Белок BDNF закодирован в последнем экзоне. Существует большое количество сплайс-вариантов мРНК *Bdnf* [68], но сплайсинг не затрагивает белок-кодирующую последовательность, присутствующую во всех транскриптах, за которой идет 3'UTR – либо длинная, либо короткая нетранслируемая область (рис. 7а, б) [69]. Предполагается, что большое число сплайс-форм нужно для тонкой регуляции локального синтеза белка в дендритах и шипиках [68]. Так, показано, что различные сплайс-варианты мРНК локализованы в различных компартментах нейронов [68]. Регуляция транскрипции осуществляется как транскрипционными факторами, чьи сайты связывания присутствуют в промоторе, реагирующими на разрядную активность нейронов, например CREB [68], так и антисмысловой (lnc)РНК *Bdnf-as*, закодированной в комплементарной цепи [64, 70]. Нужно отметить, что картированная *Bdnf-as* человека кодируется протяженной областью между *Lin7c* и частично перекрывается с *Bdnf*, длинный транскрипт сплайсируется (рис. 7а), в то время как у мыши промотор lncРНК находится в 10кб от стоп-кодона *Bdnf*. siRNA нокдаун lncРНК *Bdnf-as* приводил к 2–7-кратному увеличению мРНК *Bdnf* [64].

У нокаутных мышей с делецией промотора *Bdnf-as* уровень мРНК *Bdnf* и белка был повышен только на фоне повышения нейрональной активности после тестов, но не в покое [70]. Также эти мыши демонстрировали улучшение памяти в Y-образном лабиринте. Сайленсинг *Bdnf-as* осуществляется через связывание lncРНК с белком группы поликомб (polycomb), ремоделятором хроматина EZH2, который, в свою очередь, оставляет репрессивные триметилированные метки гистона H3 (H3K27me3) в регуляторных районах (рис. 7с) [71]. Стоит отметить, что *Bdnf* является геном, работа которого способна связать и объяснить программирующее действие стрессовых воздействий в ранний постнатальный период на последующее становление и развитие нервной системы. Так, показано *postmortem*, что в миндалине людей с ранним приобретением (< 21 года) алкоголизма наблюдается повышенный уровень транскрипта *Bdnf-as* и снижено количество метилированного аденозина (N6-methyladenosine) в этом транскрипте, что может служить прогностическим маркером раннего алкоголизма [71]. Повышенное метилирование CpG в промоторе самого *Bdnf*, а именно в сайте связывания CREB, наблюдается на модели пренатальных токсических воздействий бисфенолом А [72]. Сообщалось, что стресс вызывает гиперметилирование [73], особенно в экзоне IV BDNF [74, 75]. В mPFC социальный стресс у подростков приводит к снижению общего

уровня BDNF и транскрипта с промотора IV, повышению уровня метилирования гистона H3K9, следующего за промотором IV, и снижению ГАМКергической нейротрансмиссии, что связывают с депрессивным фенотипом [76, 77]. Такие эпигенетические изменения BDNF в mPFC после социального стресса у подростков могут быть связаны с регуляцией когнитивной дисфункции во взрослом возрасте.

Помимо регуляции на уровне транскрипции, показано, что экспрессия *Bdnf* регулируется посттранскрипционно, т.е. на уровне трансляции. Так, в дорсальных ганглиях трансляция мРНК *Bdnf* зависит от фосфорилирования кэп-связывающего белка eIF4E [67]. У трансгенных мышей eIF4ES209A с заменой серина 209 (по которому происходит фосфорилирование) на аланин значительно снижена трансляция мРНК *Bdnf*, а проноцицептивные раздражители не повышают уровень белка BDNF, несмотря на повышенный уровень мРНК *Bdnf* [67]. Примечательно, что интратекальное введение белка BDNF таким мышам дает гипералгезирующий эффект [67]. В то же время показано, что трансляция, связанная с долговременной потенциацией, опосредованная сигналингом BDNF-TRKB, имеет две фазы, в которых MAP-киназа-взаимодействующая киназа (MNK) играет двойственную роль (рис. 7d) [66]. В начальной фазе она фосфорилирует eIF4E и запускает трансляцию BDNF, а в поздней фазе, наоборот, привлекает репрессор трансляции 4E-BP2 и снижает синтез белка [66]. После трансляции на рибосоме синтезируется пре-проформа BDNF, от которой вначале отщепляется сигнальный пептид и образуется проформа proBDNF. Затем клеточные конвертазы отщепляют пропептид, образуя зрелую форму [78, 79].

proBDNF имеет свою физиологическую функцию, может также секретироваться и связываться со своим рецептором p75NTR, отличным от рецептора TrkB зрелой формы [80]. Зрелая форма оказывает свое действие через тирозинкиназный рецептор, чье действие критически важно для регуляции мощности синапсов и долговременной потенциации, а вследствие этого памяти. Проформа же действует через p75NTR, активация которого может модулировать долговременную синаптическую депрессию, приводить к апоптозу, а также коллапсировать конус роста нейронов [81]. Появляется все больше свидетельств, что пропептид в отдельности имеет биологическое действие. Так, он облегчает долговременную синаптическую депрессию в гиппокампе мышей, требующую активации NMDA-рецепторов, содержащих субъединицу GluN2B, и p75NTR-рецептора [78]. В то же время в развивающемся мозге proBDNF является превалирующей формой белка в PFC [82]. Сейчас становится все более понятно, что множественность синаптических эффектов BDNF не может быть однозначно интерпретирована, не принимая во внимание возможность совместного действия BDNF с сопутствующими продуктами его созревания [65]. Примечательно, что пропептид Val66Met (с заменой валина на метионин в 66-м положении) у человека полностью ингибирует долговременную синаптическую депрессию [78] и ухудшает память [83]. Эта несинонимичная замена нарушает внутриклеточный трафик и секрецию BDNF в ответ на нейрональную активность [78]. Показано, что этот аллель связан с повышенной встречаемостью таких психопатологий, как депрессия и тревожность [84]. У трансгенных мышей Val68Met, моделирующих данный человеческий полиморфизм, прием алкоголя самками на 12–19-й день беременности и потомками на P2–9 постнатальный день жизни приводил к снижению объема гранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа на 15-й день жизни только у BDNFmet/met и снижению нейрогенезу в гиппокампе на 90-й день [83]. Во взрослом возрасте эти потомки демонстрировали неспособность к обучению и сниженную тревожность. Однако исследования на человеке по связи этого полиморфизма с алкогольной зависимостью дают противоречивые результаты [85]. Одни исследователи говорят об их связи [84], другие, наоборот, не подтверждают этого [85]. Возможно, это связано с тем, что исследования проводились на разных популяциях людей. Однако эти результаты в целом могут указывать на важную роль проформы BDNF в высших когнитивных функциях, которая должна быть предметом будущих исследований.

Ввиду многочисленных свидетельств о том, что сигналинг BDNF нарушается при различных расстройствах нервной системы, много усилий прилагается для разработки подходов к его терапевтическому использованию. К сожалению, остаются некоторые существенные ограничения для такой терапии, а именно короткий период полураспада и побочные эффекты BDNF, а также, по мнению некоторых авторов, необходимость пересечения гематоэнцефалического барьера [86]. Кроме введения экзогенного BDNF, исследовались агенты, которые усиливают транскрипцию, трансляцию и секрецию BDNF, включая генную терапию с использованием вирусных векторов ([87], (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05040217>) и введение плазмидной ДНК, кодирующей BDNF, в наночастицах [88, 89]. Биодоставка инкапсулированных генетически модифицированных человеческих клеток, предназначенных для высвобождения BDNF, рассматривалась как терапия эпилепсии [90]. Также существуют возможности фармако-

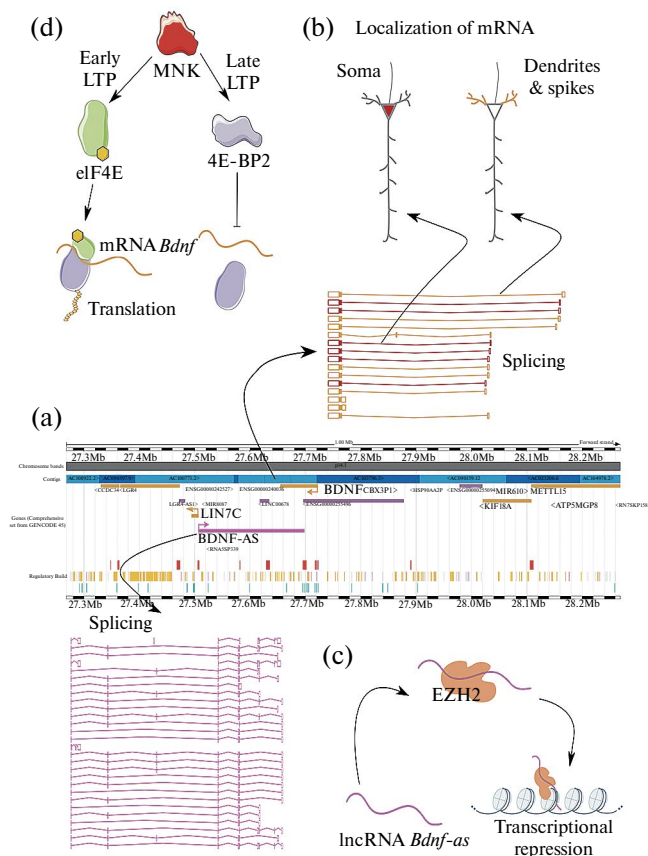


Рис. 7. Регуляция экспрессии *Bdnf*. (a) – схема локуса человека, в котором располагаются *Bdnf* и *Bdnf-as* [64]. (b) – существует большое количество сплайс вариантов мРНК *Bdnf* [68], которые могут располагаться в различных компартаментах нейрона и обеспечивать различный локальный синтез белка. (c) – антисмысловая РНК (lncРНК) *Bdnf-as*, связывается с поликомб белком EZH2 и вызывает метилирование гистонов и транскрипционную репрессию [71]. (d) – синтез белка BDNF происходит по-разному, в зависимости от фазы синаптической потенциации (LTP), что контролируется киназой MNK [66].

логического воздействия на рецепторы, с которыми связываются BDNF и его проформы. Так, малая молекула миметика BDNF-7,8-дигидроксифлавонол – активирует TrkB [91]. Также для усиления сигналинга BDNF использовались агонисты TrkB-FL (полноразмерная тропомиозин-родственная киназа B), трансактиваторы TrkB-F1 или медиаторы эффектов, опосредованных TrkB-FL, такие, как агонисты аденозинового рецептора A2A. Однако сила эффектов, опосредованных рецептором TrkB, ограничена ввиду явления эндоцитоза [92]. Антагонист рецептора p75NTR, с которым связывается proBDNF, – циклический пептид CATDIKGAEC снижает нейровоспаление, вызванное бета-амилоидом [93]. Также идентифицировано несколько антагонистов малых молекул с многообещающим терапевтическим потенциалом [94, 95]. Впрочем, результаты тестирования этих агентов и их доставки остаются противоречивыми и зачастую не воспроизводятся, поэтому даже крупные метаанализы не могут предоставить достаточно информации для разработки надежных рандомизированных клинических испытаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проекционные нейроны PFC имеют связи со множеством областей головного мозга, включая как близко и отдаленно расположенные области коры больших полушарий, так и подкорковые области. Такое распределение проекций PFC лежит в основе физиологических процессов и высшей нервной деятельности, в которых PFC играет ассоциативную роль. Между тем лишь совсем недавно появились технические возможности и были разработаны методики для детального изучения связей конкретных нейронов PFC и определения пути следования их аксонов. Исходя из освещенных в статье последних результатов, становится ясно, что организация коннектома PFC может быть сложнее, чем это представлялось ранее. Так, на смену представления о том, что каждый отдельный нейрон PFC преимущественно проецируется на одну, максимум 2 мишени, приходит понимание, что аксоны этих нейронов имеют множество коллатералей, которые могут проецироваться в самые разнообразные структуры мозга. Эти данные подкрепляют убеждение об ассоциативных функциях PFC, поскольку одновременная связь нейронов с разными областями мозга может позволять PFC координировать сложные процессы, которые, видимо, лежат в основе высших исполнительных функций, особенно развитых у людей.

Несмотря на то, что результаты, полученные на модельных животных, и в особенности на грызунах, было сложно экстраполировать на людей ввиду отсутствия анатомически гомологичных областей или несоответствия цитоархитектонического строения, последние исследования предоставляют все больше данных для установления функциональной гомологии. Так, подробное изучение нейронных контуров, образованных при участии нейронов PFC, в будущем может позволить установить гомологию между нейронами PFC разных видов, исходя из того, с какими областями мозга эти нейроны имеют связи. Создание наиболее точной модели на животных необходимо как для прояснения деталей нормального функционирования PFC, так и для изучения механизмов психических расстройств, участие PFC в которых уже хорошо показано. В настоящее время для этого прилагается множество усилий, некоторые результаты которых освещены в статье.

Несмотря на то, что за последние годы появилось множество данных, свидетельствующих о роли *Bdnf*, его полиморфизмов и его транскриптов как в физиологических процессах головного мозга, так и в патогенезе многих заболеваний, все конкретные нейронные контуры, в функционировании которых BDNF может иметь свои особенности, еще предстоит изучить. В PFC BDNF экспрессируется в глутаматергических нейронах и транссинаптически оказывает влияние на проекционные области этих нейронов. Этот транспорт BDNF может иметь особую роль для тех структур головного мозга, где не происходит собственной экспрессии BDNF. Расположение проекционных

нейронов, которые поставляют BDNF в DS, лишь недавно было картировано в PFC. Другие подобные нейронные контуры еще предстоит картировать в PFC. Потенциально это позволит в будущем манипулировать процессами, происходящими в этих нейронах или при их участии.

Таким образом, рассмотренные в статье результаты отражают интерес исследователей всего мира к устройству коннектома PFC и функций, осуществляемых при ее участии. Несомненно, более глубокое понимание этой проблемы в будущем поможет разработке методов коррекции заболеваний головного мозга, в основе которых лежит нарушение в функционировании нейронных контуров, образованных при участии нейронов PFC.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (Л. Д. А.), подбор литературы (Д. У. С., Л. Д. А., С. А. В.), написание и редактирование рукописи (Д. У. С., Л. Д. А., С. А. В.), подготовка иллюстраций (Д. У. С., Л. Д. А., Ф. Я. А.)

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 24–25–00154). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shipman ML, Johnson GC, Bouton ME, Green JT (2019) Chemogenetic Silencing of Prelimbic Cortex to Anterior Dorsomedial Striatum Projection Attenuates Operant Responding. *eneuro* 6(5): ENEURO.0125–19.2019.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0125–19.2019>
2. Liu D, Gu X, Zhu J, Zhang X, Han Z, Yan W, Cheng Q, Hao J, Fan H, Hou R, Chen Z, Chen Y, Li CT (2014) Medial Prefrontal Activity during Delay Period Contributes to Learning of a Working Memory Task. *Science* 346: 458–463.
<https://doi.org/10.1126/science.1256573>
3. Murugan M, Jang HJ, Park M, Miller EM, Cox J, Taliaferro JP, Parker NF, Liang Y, Nectow AR, Pillow JW, Witten IB, Parker NF, Bhawe V, Hur H (2017) Combined Social and Spatial Coding in a Descending Projection from the Prefrontal Cortex. *Cell* 171: 1663–1677.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.002>
4. Riceberg JS, Shapiro ML (2017) Orbitofrontal Cortex Signals Expected Outcomes with Predictive Codes When Stable Contingencies Promote the Integration of Reward History. *J Neurosci* 37: 2010–2021.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2951–16.2016>
5. Pizzagalli DA, Roberts AC (2022) Prefrontal cortex and depression. *Neuropsychopharmacology* 47: 225–246.
<https://doi.org/10.1038/s41386–021–01101–7>
6. Kenwood MM, Kalin NH, Barbas H (2022) The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 47: 260–275.
<https://doi.org/10.1038/s41386–021–01109-z>
7. Lesh TA, Niendam TA, Minzenberg MJ, Carter CS (2011) Cognitive Control Deficits in Schizophrenia: Mechanisms and Meaning. *Neuropsychopharmacology* 36: 316–338.
<https://doi.org/10.1038/npp.2010.156>

8. Nieto RR, Carrasco A, Corral S, Castillo R, Gaspar PA, Bustamante ML, Silva H (2021) BDNF as a Biomarker of Cognition in Schizophrenia/Psychosis: An Updated Review. *Front Psychiatry* 12: 662407. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.662407>
9. Krishnamurthy K, Yeung MK, Chan AS, Han YMY (2020) Effortful Control and Prefrontal Cortex Functioning in Children with Autism Spectrum Disorder: An fNIRS Study. *Brain Sci* 10: 880. <https://doi.org/10.3390/brainsci10110880>
10. Ilchibaeva T, Tsybko A, Lipnitskaya M, Eremin D, Milutinovich K, Naumenko V, Popova N (2023) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Mechanisms of Autistic-like Behavior in BTBR Mice: Crosstalk with the Dopaminergic Brain System. *Biomedicines* 11: 1482. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051482>
11. Arnsten AFT (2009) ADHD and the Prefrontal Cortex. *J Pediatr* 154: I-S43. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.01.018>
12. Donahue CJ, Glasser MF, Preuss TM, Rilling JK, Van Essen DC (2018) Quantitative assessment of prefrontal cortex in humans relative to nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721653115>
13. Goldman-Rakic PS Topography of cognition: Parallel distributed networks in primate association cortex. *Ann Rev Neurosci* 11: 137–156. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.11.030188.001033>
14. Le Merre P, Åhrlund-Richter S, Carlén M (2021) The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. *Neuron* 109: 1925–1944. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.035>
15. Hanganu-Opatz IL, Klausberger T, Sigurdsson T, Nieder A, Jacob SN, Bartos M, Sauer J-F, Durstewitz D, Leibold C, Diester I (2023) Resolving the prefrontal mechanisms of adaptive cognitive behaviors: A cross-species perspective. *Neuron* 111: 1020–1036. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.03.017>
16. Gao L, Liu S, Gou L, Hu Y, Liu Y, Deng L, Ma D, Wang H, Yang Q, Chen Z, Liu D, Qiu S, Wang X, Wang D, Wang X, Ren B, Liu Q, Chen T, Shi X, Yao H, Xu C, Li CT, Sun Y, Li A, Luo Q, Gong H, Xu N, Yan J (2022) Single-Neuron Projectome of Mouse Prefrontal Cortex. *Nature Neurosci* 25: 515–529. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01041-5>
17. Arévalo JC, Deogracias R (2023) Mechanisms Controlling the Expression and Secretion of BDNF. *Biomolecules* 13: 789. <https://doi.org/10.3390/biom13050789>
18. Galloway EM, Woo NH, Lu B (2008) Chapter 15 Persistent neural activity in the prefrontal cortex: A mechanism by which BDNF regulates working memory? In: *Progress in Brain Research*. Elsevier. 251–266. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00015-5)
19. Autry AE, Monteggia LM (2012) Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacol Rev* 64: 238–258. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005108>
20. Han M, Zeng D, Tan W, Chen X, Bai S, Wu Q, Chen Y, Wei Z, Mei Y, Zeng Y (2025) Brain region-specific roles of brain-derived neurotrophic factor in social stress-induced depressive-like behavior. *Neural Regen Res* 20: 159–173. <https://doi.org/10.4103/NRR.NRR-D-23-01419>
21. Deyama S, Duman RS (2020) Neurotrophic mechanisms underlying the rapid and sustained antidepressant actions of ketamine. *Pharmacol Biochem Behav* 188: 172837. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.172837>
22. Li Z, Ruan M, Chen J, Fang Y (2021) Major Depressive Disorder: Advances in Neuroscience Research and Translational Applications. *Neurosci Bull* 37: 863–880. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00638-3>
23. De-Paula VJ, Gattaz WF, Forlenza OV (2016) Long-term lithium treatment increases intracellular and extracellular brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cortical and hippocampal neurons at subtherapeutic concentrations. *Bipolar Disord* 18: 692–695. <https://doi.org/10.1111/bdi.12449>
24. Liu D, Tang Q-Q, Wang D, Song S-P, Yang X-N, Hu S-W, Wang Z-Y, Xu Z, Liu H, Yang J-X, Montgomery SE, Zhang H, Han M-H, Ding H-L, Cao J-L (2020) Mesocortical BDNF signaling mediates antidepressive-like effects of lithium. *Neuropsychopharmacology* 45: 1557–1566. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0713-0>
25. Fuster JM (2015) Prefrontal Cortex. In: *Comparative Neuroscience and Neurobiology. Readings from the Encyclopedia of Neuroscience*. Birkhäuser, Boston. MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6776-3_43
26. Haber SN, Liu H, Seidlitz J, Bullmore E (2022) Prefrontal connectomics: from anatomy to human imaging. *Neuropsychopharmacology* 47: 20–40. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01156-6>

27. *Ongur D* (2000) The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. *Cerebr Cortex* 10: 206–219.
<https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.206>
28. *Savage MA, McQuade R, Thiele A* (2017) Segregated fronto-cortical and midbrain connections in the mouse and their relation to approach and avoidance orienting behaviors. *J Compar Neurol* 525: 1980–1999.
<https://doi.org/10.1002/cne.24186>
29. *Menon V, D'Esposito M* (2022) The role of PFC networks in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology* 47: 90–103.
<https://doi.org/10.1038/s41386-021-01152-w>
30. *Preuss TM, Wise SP* (2022) Evolution of Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* 47: 3–19.
<https://doi.org/10.1038/s41386-021-01076-5>
31. *Spellman T, Svei M, Kaminsky J, Manzano-Nieves G, Liston C* (2021) Prefrontal deep projection neurons enable cognitive flexibility via persistent feedback monitoring. *Cell* 184: 2750–2766.e17.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.047>
32. *Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ* (2005) Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492: 145–177.
<https://doi.org/10.1002/cne.20738>
33. *Otis JM, Namboodiri VMK, Matan AM, Voets ES, Mohorn EP, Kosyk O, McHenry JA, Robinson JE, Resendez SL, Rossi MA, Stuber GD* (2017) Prefrontal cortex output circuits guide reward seeking through divergent cue encoding. *Nature* 543: 103–107.
<https://doi.org/10.1038/nature21376>
34. *Power RM, Huiskens J* (2017) A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nat Methods* 14: 360–373.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4224>
35. *Oh SW, Harris JA, Ng L, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, Kuan L, Henry AM, Mortrud MT, Ouellette B, Nguyen TN, Sorensen SA, Slaughterbeck CR, Wakeman W, Li Y, Feng D, Ho A, Nicholas E, Hirokawa KE, Bohn P, Joines KM, Peng H, Hawrylycz MJ, Phillips JW, Hohmann JG, Wohnoutka P, Gerfen CR, Koch C, Bernard A, Dang C, Jones AR, Zeng H* (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* 508: 207–214.
<https://doi.org/10.1038/nature13186>
36. *Cyranoski D* (2017) China launches brain-imaging factory. *Nature* 548: 268–269.
<https://doi.org/10.1038/548268a>
37. *Jhang J, Lee H, Kang MS, Lee H-S, Park H, Han J-H* (2018) Anterior cingulate cortex and its input to the basolateral amygdala control innate fear response. *Nat Commun* 9: 2744.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05090-y>
38. *Shipman ML, Johnson GC, Bouton ME, Green JT* (2019) Chemogenetic Silencing of Prelimbic Cortex to Anterior Dorsomedial Striatum Projection Attenuates Operant Responding. *eNeuro* 6: ENEURO.0125–19.2019.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0125-19.2019>
39. *Murugan M, Jang HJ, Park M, Miller EM, Cox J, Taliaferro JP, Parker NF, Bhawe V, Hur H, Liang Y, Nectow AR, Pillow JW, Witten IB* (2017) Combined Social and Spatial Coding in a Descending Projection from the Prefrontal Cortex. *Cell* 171: 1663–1677.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.002>
40. *Groman SM, Keistler C, Keip AJ, Hammarlund E, DiLeone RJ, Pittenger C, Lee D, Taylor JR* (2019) Orbitofrontal Circuits Control Multiple Reinforcement-Learning Processes. *Neuron* 103: 734–746.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.042>
41. *White MG, Panicker M, Mu C, Carter AM, Roberts BM, Dharmasri PA, Mathur BN* (2018) Anterior Cingulate Cortex Input to the Claustrum Is Required for Top-Down Action Control. *Cell Rep* 22: 84–95.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.023>
42. *Lodge DJ* (2011) The Medial Prefrontal and Orbitofrontal Cortices Differentially Regulate Dopamine System Function. *Neuropsychopharmacology* 36: 1227–1236.
<https://doi.org/10.1038/npp.2011.7>
43. *Carr DB, Sesack SR* (2000) Projections from the Rat Prefrontal Cortex to the Ventral Tegmental Area: Target Specificity in the Synaptic Associations with Mesoaccumbens and Mesocortical Neurons. *J Neurosci* 20: 3864–3873.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-10-03864.2000>
44. *Vázquez-Borsetti P, Celada P, Cortés R, Artigas F* (2011) Simultaneous projections from prefrontal cortex to dopaminergic and serotonergic nuclei. *Int J Neuropsychopharm* 14: 289–302.
<https://doi.org/10.1017/S1461145710000349>

45. *Dembrow N, Johnston D* (2014) Subcircuit-specific neuromodulation in the prefrontal cortex. *Front Neural Circuits* 8.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00054>
46. *Lui JH, Nguyen ND, Grutzner SM, Darmanis S, Peixoto D, Wagner MJ, Allen WE, Kebschull JM, Richman EB, Ren J, Newsome WT, Quake SR, Luo L* (2021) Differential encoding in prefrontal cortex projection neuron classes across cognitive tasks. *Cell* 184: 489–506.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.046>
47. *Bhattacharjee A, Djekidel MN, Chen R, Chen W, Tuesta LM, Zhang Y* (2019) Cell type-specific transcriptional programs in mouse prefrontal cortex during adolescence and addiction. *Nat Commun* 10: 4169.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12054-3>
48. *Binder DK, Scharfman HE* (2004) Mini Review. *Growth Factors* 22: 123–131.
<https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>
49. *Park H, Poo M* (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14: 7–23.
<https://doi.org/10.1038/nrn3379>
50. *Yamada K, Nabeshima T* (2003) Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Signaling in Memory Processes. *J Pharmacol Sci* 91: 267–270.
<https://doi.org/10.1254/jphs.91.267>
51. *Lu Y, Christian K, Lu B* (2008) BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Memory* 89: 312–323.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.018>
52. *Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S* (1997) Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport. *J Neurosci* 17: 2295–2313.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-07-02295.1997>
53. *Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ* (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389: 856–860.
<https://doi.org/10.1038/39885>
54. *Ehinger Y, Soneja D, Phamluong K, Salvi A, Ron D* (2023) Identification of Novel BDNF-Specific Corticostriatal Circuitries. *eNeuro* 10: ENEURO.0238–21.2023.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0238-21.2023>
55. *Haggerty DL, Munoz B, Pennington T, Viana Di Prisco G, Grecco GG, Atwood BK* (2022) The role of anterior insular cortex inputs to dorsolateral striatum in binge alcohol drinking. *eLife* 11: e77411.
<https://doi.org/10.7554/eLife.77411>
56. *Jeanblanc J, Logrip ML, Janak PH, Ron D* (2013) BDNF – mediated regulation of ethanol consumption requires the activation of the MAP kinase pathway and protein synthesis. *Eur J Neurosci* 37: 607–612.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12067>
57. *Andreska T, Rauskolb S, Schukraft N, Lüningschrör P, Sasi M, Signoret-Genest J, Behringer M, Blum R, Sauer M, Tovote P, Sendtner M* (2020) Induction of BDNF Expression in Layer II/III and Layer V Neurons of the Motor Cortex Is Essential for Motor Learning. *J Neurosci* 40: 6289–6308.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0288-20.2020>
58. *Vandaele Y, Mahajan NR, Ottenheimer DJ, Richard JM, Mysore SP, Janak PH* (2019) Distinct recruitment of dorsomedial and dorsolateral striatum erodes with extended training. *eLife* 8: e49536.
<https://doi.org/10.7554/eLife.49536>
59. *Gourley SL, Zimmermann KS, Allen AG, Taylor JR* (2016) The Medial Orbitofrontal Cortex Regulates Sensitivity to Outcome Value. *J Neurosci* 36: 4600–4613.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4253-15.2016>
60. *Giannotti G, Barry SM, Siemsen BM, Peters J, McGinty JF* (2018) Divergent Prelimbic Cortical Pathways Interact with BDNF to Regulate Cocaine-seeking. *J Neurosci* 38: 8956–8966.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1332-18.2018>
61. *Berglind WJ, Whitfield TW, LaLumiere RT, Kalivas PW, McGinty JF* (2009) A Single Intra-PFC Infusion of BDNF Prevents Cocaine-Induced Alterations in Extracellular Glutamate within the Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 29: 3715–3719.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5457-08.2009>
62. *Cunha* (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3: 1.
<https://doi.org/10.3389/fneuro.02.001.2010>
63. *Ruiz CR, Shi J, Meffert MK* (2014) Transcript specificity in BDNF-regulated protein synthesis. *Neuropharmacology* 76 Pt C: 657–663.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.004>

64. *Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, Brothers SP, van der Brug MP, Wahlestedt C* (2012) Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat Biotechnol* 30: 453–459.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2158>
65. *Bogacheva PO, Molchanova AI, Pravdivceva ES, Miteva AS, Balezina OP, Gaydukov AE* (2022) ProBDNF and Brain-Derived Neurotrophic Factor Prodomain Differently Modulate Acetylcholine Release in Regenerating and Mature Mouse Motor Synapses. *Front Cell Neurosci* 16: 866802.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.866802>
66. *Panja D, Kenney JW, D'Andrea L, Zalfa F, Vedeler A, Wibrand K, Fukunaga R, Bagni C, Proud CG, Bramham CR* (2014) Two-Stage Translational Control of Dentate Gyrus LTP Consolidation Is Mediated by Sustained BDNF-TrkB Signaling to MNK. *Cell Rep* 9: 1430–1445.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.016>
67. *Moy JK, Khoutorsky A, Asiedu MN, Dussor G, Price TJ* (2018) eIF4E Phosphorylation Influences Bdnf mRNA Translation in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. *Front Cell Neurosci* 12: 29.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00029>
68. *Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E* (2011) Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16813–16818.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1014168108>
69. *O'Neill KM, Donohue KE, Omelchenko A, Firestein BL* (2018) The 3' UTRs of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcripts Differentially Regulate the Dendritic Arbor. *Front Cell Neurosci* 12: 60.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00060>
70. *Modarresi F, Pedram Fatemi R, Razavipour SF, Ricciardi N, Makhmutova M, Khoury N, Magistri M, Volmar C-H, Wahlestedt C, Faghihi MA* (2021) A novel knockout mouse model of the noncoding antisense Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) gene displays increased endogenous Bdnf protein and improved memory function following exercise. *Heliyon* 7: e07570.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07570>
71. *Bohnsack JP, Teppen T, Kyzar EJ, Dzitoyeva S, Pandey SC* (2019) The lncRNA BDNF-AS is an epigenetic regulator in the human amygdala in early onset alcohol use disorders. *Transl Psychiatr* 9: 34.
<https://doi.org/10.1038/s41398-019-0367-z>
72. *Kundakovic M, Gudsnuik K, Herbstman JB, Tang D, Perera FP, Champagne FA* (2015) DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 6807–6813.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1408355111>
73. *Ju L-S, Yang J-J, Lei L, Xia J-Y, Luo D, Ji M-H, Martynyuk AE, Yang J-J* (2017) The Combination of Long-term Ketamine and Extinction Training Contributes to Fear Erasure by Bdnf Methylation. *Front Cell Neurosci* 11: 100.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00100>
74. *Blaze J, Roth TL* (2017) Caregiver maltreatment causes altered neuronal DNA methylation in female rodents. *Dev Psychopathol* 29: 477–489.
<https://doi.org/10.1017/S0954579417000128>
75. *Wearick-Silva LE, Orso R, Martins LA, Creutzberg KC, Centeno-Silva A, Xavier LL, Grassi-Oliveira R, Mestriner RG* (2019) Dual influences of early life stress induced by limited bedding on walking adaptability and Bdnf/TrkB and Drd1/Drd2 gene expression in different mouse brain regions. *Behav Brain Res* 359: 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.025>
76. *Xu H, Wang J, Zhang K, Zhao M, Ellenbroek B, Shao F, Wang W* (2018) Effects of adolescent social stress and antidepressant treatment on cognitive inflexibility and Bdnf epigenetic modifications in the mPFC of adult mice. *Psychoneuroendocrinology* 88: 92–101.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.11.013>
77. *Xu H, Wang J, Jing H, Ellenbroek B, Shao F, Wang W* (2021) mPFC GABAergic transmission mediated the role of BDNF signaling in cognitive impairment but not anxiety induced by adolescent social stress. *Neuropharmacology* 184: 108412.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108412>
78. *Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Lume M, Matsumoto T, Hara T, Yamawaki S, Takahashi M, Shiosaka S, Itami C, Uegaki K, Saarma M, Kojima M* (2015) BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1422336112>

79. Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Kojima M (2016) Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: Multi-ligand model of growth factor signaling. *Pharmacol Res* 105: 93–98.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.019>
80. Camuso S, La Rosa P, Fiorenza MT, Canterini S (2022) Pleiotropic effects of BDNF on the cerebellum and hippocampus: Implications for neurodevelopmental disorders. *Neurobiol Dis* 163: 105606.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105606>
81. Lanshakov DA, Sukhareva EV, Bulygina VV, Bannova AV, Shaburova EV, Kalinina TS (2021) Single neonatal dexamethasone administration has long-lasting outcome on depressive-like behaviour, Bdnf, Nt-3, p75ngfr and sorting receptors (SorCS1–3) stress reactive expression. *Sci Rep* 11: 8092.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-87652-7>
82. Menshanov PN, Lanshakov DA, Dygalo NN (2015) proBDNF Is a Major Product of bdnf Gene Expressed in the Perinatal Rat Cortex. *Physiol Res* 64(6): 925–934.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.932996>
83. Bird CW, Baculis BC, Mayfield JJ, Chavez GJ, Ontiveros T, Paine DJ, Marks AJ, Gonzales AL, Ron D, Valenzuela CF (2019) The brain-derived neurotrophic factor VAL68MET polymorphism modulates how developmental ethanol exposure impacts the hippocampus. *Genes Brain Behav* 18: e12484.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12484>
84. Nees F, Witt SH, Dinu-Biringer R, Lourdasamy A, Tzschoppe J, Vollstädt-Klein S, Millenet S, Bach C, Poustka L, Banaschewski T, Barker GJ, Bokde ALW, Bromberg U, Büchel C, Conrod PJ, Frank J, Frouin V, Gallinat J, Garavan H, Gowland P, Heinz A, Ittermann B, Mann K, Martinot J-L, Paus T, Pausova Z, Robbins TW, Smolka MN, Rietschel M, Schumann G, Flor H (2015) BDNF Val66Met and reward-related brain function in adolescents: role for early alcohol consumption. *Alcohol* 49(2): 103–110.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.12.004>
85. Muschler MAN, Heberlein A, Frieling H, Vogel N, Becker C-M, Kornhuber J, Bleich S, Hillemacher T (2011) Brain-derived neurotrophic factor, Val66Met single nucleotide polymorphism is not associated with alcohol dependence. *Psychiat Genet* 21: 53–54.
<https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e32834133ab>
86. Gao L, Zhang Y, Sterling K, Song W (2022) Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Transl Neurodegener* 11: 4.
<https://doi.org/10.1186/s40035-022-00279-0>
87. Katsu-Jiménez Y, Loria F, Corona JC, Díaz-Nido J (2016) Gene Transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Prevents Neurodegeneration Triggered by FXN Deficiency. *Mol Therap* 24: 877–889.
<https://doi.org/10.1038/mt.2016.32>
88. Xia M, Zhao T, Wang X, Li Y, Li Y, Zheng T, Li J, Feng Y, Wei Y, Sun P (2021) Brain-derived Neurotrophic Factor and Its Applications through Nanosystem Delivery. *Iran J Pharm* 20(4): 137–151.
<https://doi.org/10.22037/ijpr.2021.115705.15484>
89. Lopes CDF, Gonçalves NP, Gomes CP, Saraiva MJ, Pego AP (2017) BDNF gene delivery mediated by neuron-targeted nanoparticles is neuroprotective in peripheral nerve injury. *Biomaterials* 121: 83–96.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.12.025>
90. Falcicchia C, Paolone G, Emerich DF, Lovisari F, Bell WJ, Fradet T, Wahlberg LU, Simonato M (2018) Seizure-Suppressant and Neuroprotective Effects of Encapsulated BDNF-Producing Cells in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Mol Therap – Methods Clin Develop* 9: 211–224.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.03.001>
91. Yang S, Zhu G (2022) 7,8-Dihydroxyflavone and Neuropsychiatric Disorders: A Translational Perspective from the Mechanism to Drug Development. *Curr Neuropharmacol* 20(8): 1479–1497.
<https://doi.org/10.2174/1570159X19666210915122820>
92. Miranda-Lourenço C, Ribeiro-Rodrigues L, Fonseca-Gomes J, Tanqueiro SR, Belo RF, Ferreira CB, Rei N, Ferreira-Manso M, De Almeida-Borlido C, Costa-Coelho T, Freitas CF, Zavalco S, Mouro FM, Sebastião AM, Xapelli S, Rodrigues TM, Diógenes MJ (2020) Challenges of BDNF-based therapies: From common to rare diseases. *Pharmacol Res* 162: 105281.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105281>
93. Yaar M, Arble BL, Stewart KB, Qureshi NH, Kowall NW, Gilchrist BA (2008) p75NTR Antagonistic Cyclic Peptide Decreases the Size of β Amyloid-Induced Brain Inflammation. *Cell Mol Neurobiol* 28: 1027–1031.
<https://doi.org/10.1007/s10571-008-9298-6>

94. Yang T, Tran KC, Zeng AY, Massa SM, Longo FM (2020) Small molecule modulation of the p75 neurotrophin receptor inhibits multiple amyloid beta-induced tau pathologies. *Sci Rep* 10: 20322. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77210-y>
95. Mossa AH, Galan A, Cammisotto PG, Velasquez Flores M, Shamout S, Barcelona P, Saragovi HU, Campeau L (2020) Antagonism of proNGF or its receptor p75NTR reverses remodelling and improves bladder function in a mouse model of diabetic voiding dysfunction. *Diabetologia* 63: 1932–1946. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05222-4>
96. Allen Reference Atlas – Human Brain [brain atlas]. Available from atlas.brain-map.org.
97. Allen Reference Atlas – Mouse Brain [brain atlas]. Available from atlas.brain-map.org.
98. Allen Institute for Brain Science (2004). Allen Mouse Brain Atlas [dataset]. Available from mouse.brain-map.org. Allen Institute for Brain Science (2011).

Projection Neurons of the Prefrontal Cortex, their Participation in the Formation of Various Forms of Behavior and Expression in them of Brain-derived Neurotrophic Factor

U. S. Drozd^a, Y. A. Frik^{a, b}, A. V. Smagin^a, and D. A. Lanshakov^{a, b, c, *}

^a*The Institute of Cytology and Genetic SB RAS, Novosibirsk, Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

^c*Novosibirsk Medical State University, Novosibirsk, Russia*

^{*}*e-mail: lanshakov@bionet.nsc.ru*

The prefrontal cortex (PFC) plays a key role in cognitive plasticity and is involved in various processes of higher nervous activity. At the same time, studying the processes underlying various forms of behavior in which PFC neurons participate is a non-trivial task. The associative functions of the PFC are associated with the nature of the connectivity of this structure with other areas of the brain, which, according to recent data, is much more complex than previously thought. Thus, it becomes clear that the axons of PFC projection neurons have many collaterals projecting to many different targets in the brain. In this review, we highlight the latest results in studying the connectivity of PFC neurons using the latest methods for analyzing projections and single-cell transcriptomes. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays an important role in the functioning of these neurons and their projection targets, but the transport of this neurotrophin by PFC projection neurons to structures where it is not locally expressed may be especially important. We review recent results mapping such neurons in the PFC, highlighting *Bdnf* expression and potential role in the pathogenesis of mental disorders.

Keywords: prefrontal cortex, connectivity, projection neurons, brain-derived neurotrophic factor

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ПРИРОДА СПОНТАННОЙ ТОНИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ОПОРНОЙ
РАЗГРУЗКИ, ВЫЯВЛЕННАЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ CLP290,
НОВОГО АКТИВАТОРА КАЛИЙ-ХЛОРИДНОГО КО-ТРАНСПОРТЕРА
СПИННОГО МОЗГА**

© 2024 г. В. Е. Калашников¹*, К. В. Сергеева¹, О. В. Туртикова¹, С. А. Тыганов¹,
Т. М. Мирзоев¹, Б. С. Шенкман¹

¹Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: vitaliy.kalasnikov@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 24.06.2024 г.

Принята к публикации 02.07.2024 г.

Общеизвестно, что электромиографическая активность камбаловидной мышцы отражает ее функциональную активность. Опорная разгрузка приводит к моментальному устранению электрической активности в камбаловидной мышце, которая возобновляется сразу после восстановления опорной нагрузки. Однако при длительной опорной разгрузке в камбаловидной мышце наблюдается возникновение спонтанной электрической активности. В предыдущих работах нами была показана связь между этой активностью и содержанием калий-хлоридного котранспортера (KCC2) на мембранах мотонейронов спинного мозга, а также возможность устранения спонтанной активности мышцы введением активатора KCC2 прохлорперазина. Целью данной работы было изучить влияние CLP290, альтернативного активатора KCC2, на спонтанную тоническую активность камбаловидной мышцы крысы. Обнаружено, что ежедневное введение крысам CLP290 на фоне 14-суточного антиортостатического вывешивания предотвращает снижение содержания KCC2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга и рост спонтанной тонической активности в камбаловидной мышце. При этом не обнаружено статистически значимых отличий площади поперечного сечения волокон медленного типа в группах антиортостатического вывешивания с введением и без введения CLP290.

Ключевые слова: KCC2, прохлорперазин, CLP290, антиортостатическое вывешивание, спонтанная мышечная активность

DOI: 10.31857/S0869813924080048, **EDN:** BDCUCD

ВВЕДЕНИЕ

В ряде работ было показано [1, 2], что в случае, когда разгрузка носит длительный (более 3 суток) характер, электрическая активность в *m. soleus* появляется и в отсутствие опоры. Амплитуда этой активности после третьих суток разгрузки постепенно нарастает к 14-м суткам, достигая значений, характерных для контрольных животных. Это явление получило название спонтанной тонической активности. При этом вопрос

о природе такой активности и лежащих в ее основе физиологических механизмах до некоторых пор оставался открытым.

Вместе с тем в последнее десятилетие в связи с изучением механизмов развития спастичности после спинальной травмы или инсульта активно исследуются механизмы изменения возбудимости мотонейронов в этих патологических состояниях. Показано, что снижение содержания в мотонейронах спинного мозга калий-хлоридного котранспортера (potassium chloride cotransporter 2, KCC2) приводит к сдвигу мембранного потенциала покоя в положительную сторону (с -75 до -65 мВ), что, в свою очередь, заменяет тормозные эффекты глицина и ГАМК возбуждающими и вызывает повышение мышечной активности, а впоследствии приводит к мышечной спастичности [3, 4].

Ранее нами было обнаружено, что нарастание спонтанной тонической активности в камбаловидной мышце крысы на фоне 7-суточной функциональной разгрузки задних конечностей также сопровождается снижением содержания KCC2 в поясничном отделе спинного мозга [5]. Как и при спинальной травме, такое снижение должно приводить к сдвигу мембранного потенциала мотонейронов, повышать возбудимость мотонейронов и соответственно порождать спонтанную электрическую активность мышцы. Мы показали, что введение активатора KCC2 прохлорперазина предотвращает как снижение содержания KCC2 в спинном мозге, так и нарастание интегральной электромиографической активности (ЭМГ-активность) камбаловидной мышцы, что позволило нам сделать выводы о ключевой роли KCC2 в механизме генерации спонтанной тонической активности.

Несмотря на полученные результаты, в отношении некоторых параметров введение прохлорперазина показало неоднозначные эффекты, поднимающие вопрос о возможном неспецифическом системном воздействии прохлорперазина непосредственно на камбаловидную мышцу, в обход KCC2-зависимого механизма [6]. Для выяснения того, в какой мере эффекты введения прохлорперазина обусловлены его влиянием на содержание KCC2 в мотонейронах спинного мозга, а не иными причинами, было решено использовать внутрибрюшинное введение другого активатора KCC2, CLP290. Названный препарат является высокоселективным активатором KCC2 [7], в отличие от менее селективного прохлорперазина. Сравнение действия CLP290 и прохлорперазина позволит выявить эффекты, связанные непосредственно с активацией KCC2 (эти эффекты будут общими в группах с введением CLP290 и прохлорперазина, поскольку оба препарата активируют KCC2); эффекты, уникальные для той или иной группы с введением препарата будут вызваны побочными действиями препаратов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. В двух экспериментальных сериях самцы крыс Вистар в возрасте 1.5–2 месяцев и массой тела 180–200 г были распределены на следующие группы по 14 животных в каждой: С – группа контроля с ежедневным введением физиологического раствора; CL – группа контроля с ежедневным введением CLP290; HS – группа антиортостатического вывешивания с ежедневным введением физиологического раствора; HSL – группа вывешивания с ежедневным введением CLP290. CLP290 (Macklin, Китай) вводили внутрибрюшинно один раз в день в дозировке 100 мг/кг в 15%-ном растворе циклодекстрина. Раствор фильтровали через бактериальный фильтр с размером пор 0.22 мкм.

В первой экспериментальной серии после эвтаназии животных камбаловидные мышцы и поясничный отдел спинного мозга извлекались и замораживались в жидком азоте для проведения биохимического анализа. Во второй экспериментальной серии производилось вживление электродов в камбаловидную мышцу с последующей записью электромиограммы. Температуру и влажность в помещении вивария поддерживали на уровне 24°C и 50% соответственно при 12/12-часовом цикле свет/

темнота. Все крысы имели доступ к стандартной диете и воде. Эвтаназия животных проводилась посредством внутрибрюшинного введения 10%-ного раствора авертина (10 мл/кг).

Имплантация электродов в камбаловидную мышцу. Электромиограмму *m. soleus* крысы записывали с использованием внутримышечных электродов. В качестве электродов использовались многожильные провода из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием (A-M Systems, США). С проводов снималась изоляция на участке в 2 мм, после чего их имплантировали в камбаловидную мышцу правой задней конечности крысы и подкожно вели от мышцы к розетке, расположенной на спине крысы. В широких полях розетки имеются отверстия для пришивания ее к коже спины крысы. Операцию по вживлению электродов в *m. soleus* крыс проводили под общим наркозом с соблюдением правил асептики и антисептики. Использовали Zoletil-100 в дозе 28 мг/кг внутримышечно и ксилазина гидрохлорид (XylaVET 20 мг/мл) в дозе 0.28 мл/кг массы внутримышечно. Шерстный покров в местах доступа к мышцам удаляли ветеринарным триммером Codors. Для доступа к *m. soleus* делали разрез около 1.5 см на боковой поверхности голени. Для установки розетки делали разрез около 1.5 см над поясничным отделом позвоночника. Кровотечение из сосудов кожи спины останавливали электрокоагулятором. Провода фиксировали с помощью узлов из этилона (Ethilon 4–0, игла 19 мм, 3/8, обратно-режущая игла, W1619T, Ethicon, США) выше и ниже места выхода из мышцы. Розетка с пришитым к ней овалом из тонкого силикона устанавливалась в рану на пояснице и пришивалась к коже этилоном. Мышцы и фасции на ноге ушивались викрилом (Vicril 5–0, игла 11 мм, 3/8, обратно-режущая игла, W9501T, Ethicon, США), а кожа – этилоном. После операции крысе подкожно вводили около 5 мл физраствора и бициллин-3 однократно в дозе 120 тыс. ед/кг. Далее животное восстанавливалось в течение 7 дней до проведения электрофизиологических исследований.

Обработка ЭМГ. Усиление электромиографического сигнала осуществлялось с помощью усилителя AM-Systems 1700 DIFFERENTIAL AC AMPLIFIER с частотой дискретизации в 5 кГц. Сырой сигнал фильтровался с помощью low cut-off (100 Гц) и high cut-off (5000 Гц) фильтров. В течение 1 суток проводилась запись контрольных значений ЭМГ, после чего животные вывешивались. Запись ЭМГ проводилась ежедневно по 45 мин. Обработка полученного сигнала проводилась с помощью АЦП модуля L-CARD E14-440D и программного обеспечения LGRAPH2 и Powergraph 3.3. Для оценки спектральной характеристики полученного сигнала использовалось быстрое преобразование Фурье (FFT), после чего применялись дополнительные цифровые bandpass фильтры. После этого строилась RMS-огibaющая модуля значений полученного сигнала и высчитывался интеграл этой огibaющей.

Анализ содержания белков в нервной ткани поясничного отдела спинного мозга. Замороженные образцы поясничного отдела спинного мозга крыс гомогенизировали в буфере RIPA (cat #sc-24948; Santa Cruz Biotechnology, Даллас, Техас, США), после чего центрифугировали в течение 15 мин при 12000 об/мин при температуре 4 °С. Супернатант отделяли и измеряли концентрацию белка методом Брэдфорда. Электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле с использованием мини-системы Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США) в течение 1 ч при токе 17 мА на гель. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США) осуществляли в мини-системе транс-блоттинга (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США) в течение 2 ч при температуре 4 °С и постоянном напряжении 100 В. Затем проводили инкубацию мембраны (15 ч, 4 °С) с первичными антителами против KCC2 (1:1000, кат. № 07-432; Merck, Берлингтон, Массачусетс, США), NKCC (1:1000, регистрационный номер ab_528406; DSHB, Айова-Сити, IA, США) и тубулина (cat #ab176560; Abcam, Бостон, Массачусетс, США). После этого мембраны промывали в PBST (3 раза по 5 мин) и инкубировали со вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика (1:30000, #111-035-003; Jackson ImmunoResearch, Уэст-Гроув, Пенсильвания, США).

Белковые бэнды на мембране визуализировались с использованием Clarity Western ECL (№ 1705061; Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США). Белковые полосы определяли количественно с помощью блот-сканера C-DiGit (LI-COR Biotechnology, Линкольн, Северная Каролина, США) и программного обеспечения Image Studio Digits. Содержание KCC2 и NKCC1 нормировалось на референсный белок, в качестве которого использовался тубулин.

Морфометрический анализ. Анализ размеров мышечных волокон проводили на срезах, окрашенных с помощью моноклональных антител против быстрых и медленных изоформ тяжелых цепей миозина. С помощью криомикротомы фирмы Leica изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили при -20°C . Перед окрашиванием срезы оттаивали и регидратировали при комнатной температуре в фосфатно-буферном растворе (PBS) в течение 20 мин, а затем инкубировали с антителами против тяжелых цепей миозина быстрого или медленного типов (MHC I и MHC II, Sigma, США) 1: 400 в PBS во влажной камере при 37°C в течение часа (или при 4°C на ночь). Затем антитела отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor, 1:500 в PBS проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду (Fluoromount Aqueous Mounting Medium, Sigma Aldrich, США), стабилизирующую флуоресцентную метку. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica Q500MC с встроенной цифровой фотокамерой (TCM 300F, Leica, Германия), с увеличением $\times 200$. Анализ изображений проводился с помощью программы ImageJ. Измеряли площадь поперечного сечения (ППС) по крайней мере 100 волокон, подсчитывали число волокон медленного и быстрого типов и их количественное соотношение.

Статистический анализ. Для сравнения групп друг с другом был использован непараметрический критерий Крускала – Уоллиса. Для статистического анализа использовался программный пакет SigmaPlot 12.5. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартной ошибки среднего значения (выраженной в процентах от среднего значения контрольной группы). Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние CLP290 на динамику электрической активности камбаловидной мышцы при антиортостатическом вывешивании. Интегральная ЭМГ-активность камбаловидной мышцы в первые сутки антиортостатического вывешивания снизилась до 20% от контрольных значений. Начиная с третьих суток вывешивания, наблюдалось статистически значимое отличие в уровне интегральной ЭМГ-активности между группами с введением и без введения CLP290. В группе «чистого» вывешивания интегральная ЭМГ-активность нарастала, к 12-м суткам достигая 90% от уровня контроля. В группе с внутрибрюшинным введением CLP290 уровень интегральной ЭМГ-активности за все время антиортостатического вывешивания не превысил 30% от уровня контроля (рис. 1, 2). Анализ ЭМГ-сигнала камбаловидной мышцы также показал, что средние значения величины медианной частоты (рис. 3) существенно не отличались между группами с введением и без введения CLP290 в течение всего периода антиортостатического вывешивания.

Воздействие CLP290 на содержание KCC2 в мотонейронах спинного мозга. Содержание хлоридного котранспортера KCC2 в поясничном отделе спинного мозга экспериментальных животных статистически значимо снизилось после 7-суточного вывешивания в сравнении с группой контроля, при этом в группе вывешивания с введением CLP290 отличий от группы контроля не было (рис. 4).

Воздействие CLP290 на массу мышц и размеры мышечных волокон. После проведения эксперимента с антиортостатическим 7-суточным вывешиванием крыс на фоне

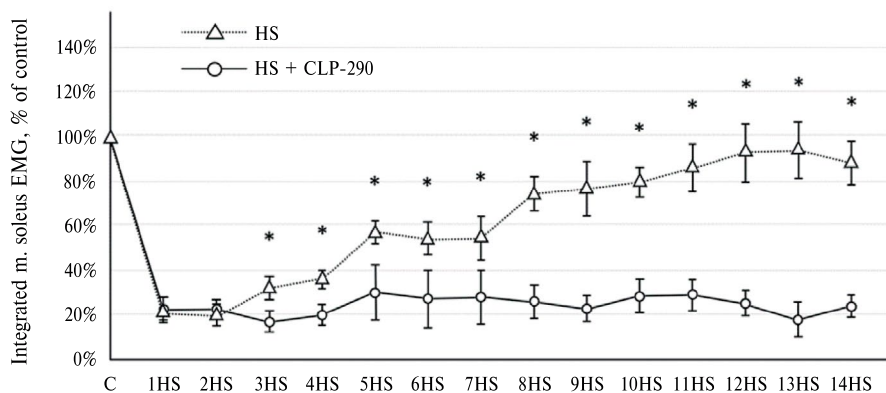


Рис. 1. Динамика интегральной ЭМГ-активности камбаловидной мышцы на фоне 14-суточного антиорто-статического вывешивания с введением и без введения CLP290. * статистически значимое между группами с введением и без введения препарата ($p < 0.05$).

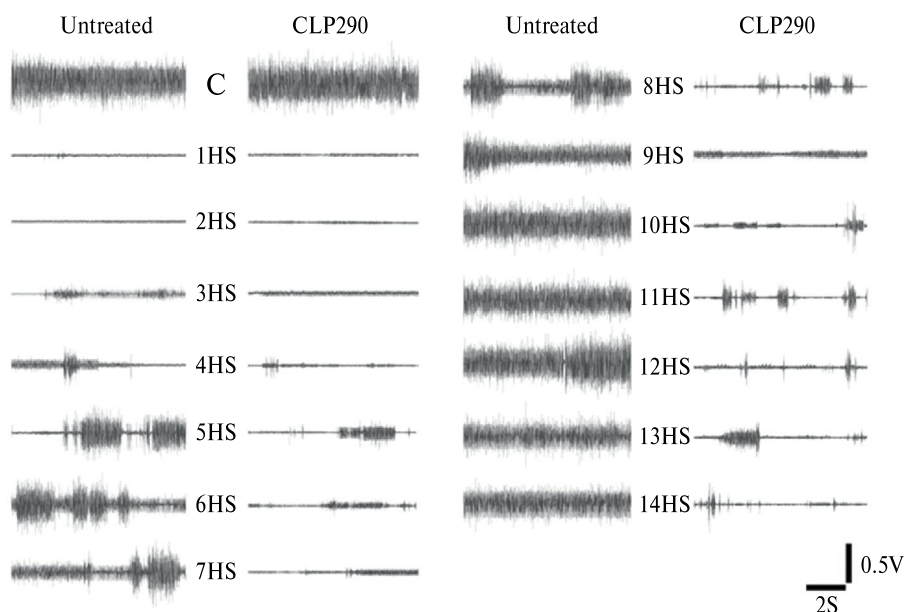


Рис. 2. Типичные паттерны ЭМГ-активности камбаловидной мышцы перед антиорто-статическим вывешиванием (C) и во время 14-дневного вывешивания (1–14HS) у крыс без введения и с введением CLP290.

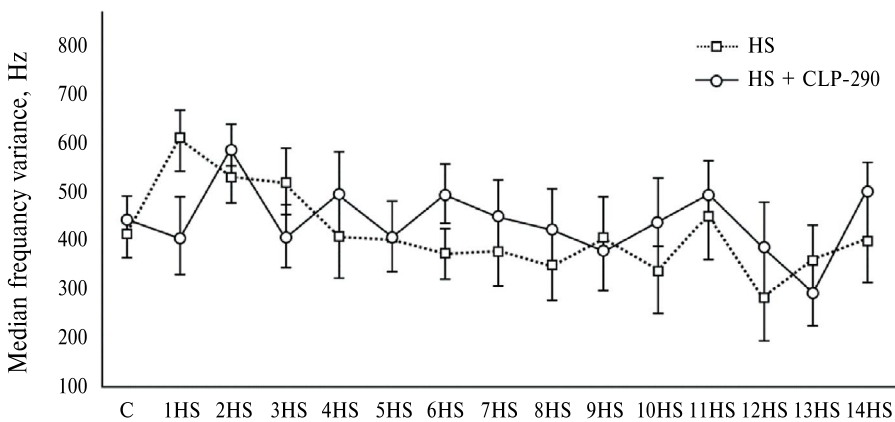


Рис. 3. Медианная частота ЭМГ-активности камбаловидной мышцы на фоне 14-суточного антиортостатического вывешивания с введением и без введения CLP290.

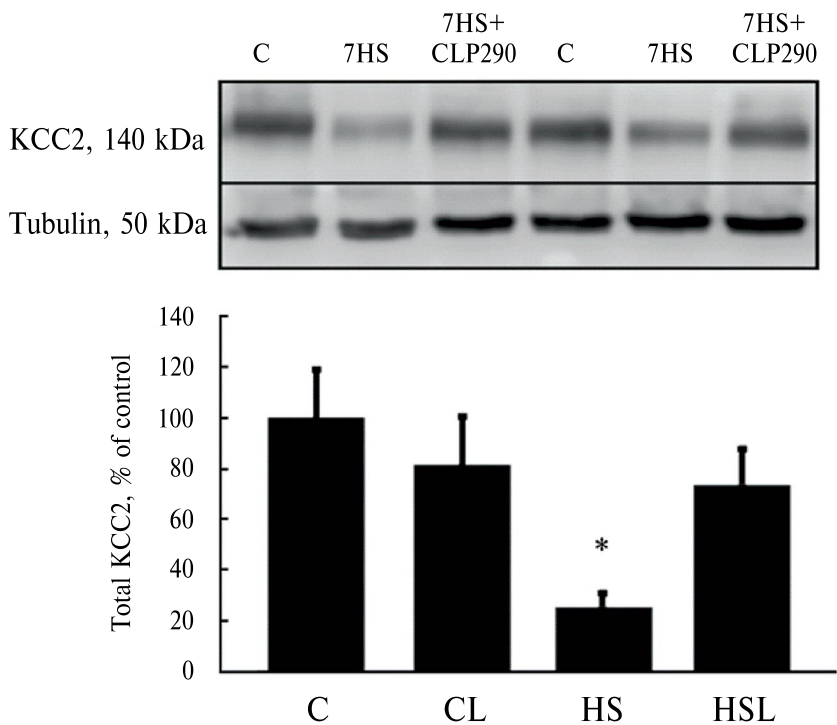


Рис. 4. Содержание KCC2 в спинном мозге экспериментальных животных. C – контроль; CL – вывешивание в течение 7 суток; HS – вывешивание в течение 7 суток; HSL – вывешивание в течение 7 суток с ежедневным введением CLP290. Данные представлены как среднее $\pm$ σ . * – отличие от контроля ($p < 0.05$).

введения препарата CLP290 масса тела животных не имела статистически значимых отличий между экспериментальными группами (табл. 1). Масса *m. soleus* снижалась в группах с моделируемой гравитационной разгрузкой «HS» и «HSL» по сравнению с контрольными группами «С» и «CL» при отсутствии межгрупповых отличий у вывешенных животных. Параметр «масса мышцы / масса тела» традиционно применяется как достаточно простой критерий оценки развития атрофических процессов в мышце. Через 7 суток вывешивания этот параметр был значимо снижен в группах «HS» и «HSL» по сравнению с контролем «С» и группой «CL» (табл. 1).

Таблица 1. Абсолютная масса *m. soleus* и масса *m. soleus*, нормированная на массу тела

	С	CL	HS	HSL
Масса тела крыс, г	225.43 ± 7.61	211.25 ± 7.69	212.25 ± 4.86	210.88 ± 6.75
Масса <i>m. soleus</i> , мг	104.29 ± 3.57	103.13 ± 5.31	66.13 ± 2.05*	72.13 ± 3.94*
Масса <i>m. soleus</i> /масса тела крысы, мг/г	0.46 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.31 ± 0.01*	0.34 ± 0.02*

ППС «быстрых» и «медленных» мышечных волокон была статистически значимо снижена в группе чистого вывешивания «HS» в сравнении с группами «С» и «CL». В группе «HSL» ППС волокон обоих типов была также статистически значимо снижена в сравнении с группами «С» и «CL» (рис. 5). Между группами HS и HSL статистически значимых отличий по этим параметрам не было обнаружено.

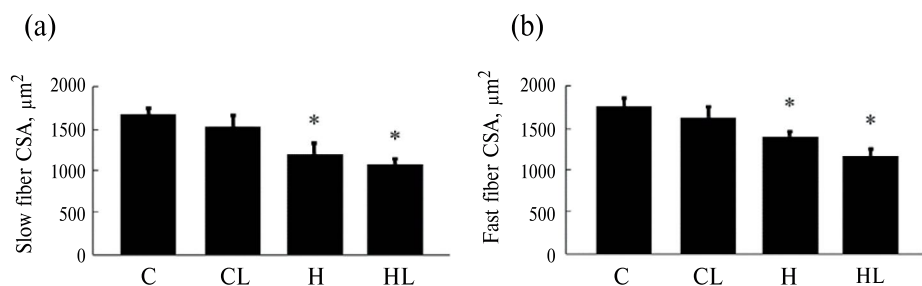


Рис. 5. Площадь поперечного сечения медленных (а) и быстрых (б) мышечных волокон в *m. soleus* крысы. С – контроль; CL – вывешивание + введение CLP290 7 дней; HS – вывешивание 7 дней; HSL – вывешивание + введение CLP290 7 дней. * – отличие от контроля ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ЭМГ-активность камбаловидной мышцы в большей степени, чем любой другой мышцы голени, коррелирует с опорной нагрузкой задней конечности [8]. При функциональной разгрузке конечности ЭМГ-активность *m. soleus* моментально угасает до нуля, возобновляясь сразу же после того, как конечность обретает опору [1,

2, 5, 9, 10]. Эта особенность камбаловидной мышцы объясняется спецификой выполняемой ею работы: одной из основных функций *m. soleus* является поддержание стабильности угла голеностопного сустава при статической позе животного и осуществление его тыльного разгибания при локомоции. Часто эта мышца полностью принимает на себя опорную нагрузку задней конечности, что предполагает ее длительную, почти непрерывную активность [11]. Фактически *m. soleus* активна не менее 11 ч в сутки, прерываясь только во время сна и покоя животного [11]. Учитывая вышесказанное, вполне ожидаемо было бы наблюдать полное отсутствие ЭМГ-активности камбаловидной мышцы при устранении опоры. Однако, как показали в 1987 г. Alford с соавт., ЭМГ-активность камбаловидной мышцы крысы отсутствует только в первые двое – трое суток антиортостатического вывешивания. Начиная с третьих суток вывешивания, ЭМГ-активность появляется и в отсутствие опоры [1]. При этом интегральная ЭМГ-активность нарастает, достигая значений, характерных для нагруженной мышцы к 14-м суткам вывешивания [1]. В дальнейшем этот эффект, получивший название спонтанной тонической активности, в том или ином виде воспроизводился в работах различных авторов [2, 5, 9, 10].

В настоящем исследовании мы наблюдали аналогичный рост ЭМГ-активности камбаловидной мышцы на протяжении 14 суток антиортостатического вывешивания. К пятым суткам вывешивания электрическая активность мышцы возросла до 50% от контрольных значений; к двенадцатым суткам достигнув 90%. Важным, однако, является вопрос о физиологической природе спонтанной тонической активности и лежащих в ее основе молекулярных механизмах. Схожесть сигнальных процессов, обуславливающих перестройку тонической мускулатуры при различных моделях функциональной разгрузки конечности, позволила нам обратить внимание на известный феномен возникновения непроизвольных мышечных сокращений, приводящих к спастичности при спинальных травмах.

Как показали в 2010 г. на модели спинальной травматизации животных Boulenguez с соавт., причиной возникновения этой спастичности является снижение содержания в мотонейронах спинного мозга калий-хлоридного котранспортера KCC2 и его антагониста NKCC1 [3]. Важной функцией KCC2, активно экспрессирующегося в зрелых мотонейронах, является установление необходимого для постсинаптического ингибирования градиента хлорид-ионов посредством трансмембранного ионного транспорта [12]. Молекулы KCC2 и NKCC1 транспортируют хлорид-ионы в противоположных направлениях: KCC2 – из клетки, а NKCC1 – в клетку. Таким образом, баланс хлорид-ионов на мембране нейрона находится в зависимости от относительных уровней экспрессии этих ионных котранспортеров. В неповрежденных зрелых мотонейронах экспрессия KCC2 выше экспрессии NKCC1, что приводит к повышению концентрации ионов Cl^- с наружной стороны мембраны нейрона. Связывание ГАМК с рецепторами на поверхности мембраны открывает мембранные ионные каналы, в результате чего происходит приток ионов Cl^- в нейрон в соответствии с градиентом концентрации. Это вызывает гиперполяризацию мембраны, что и обуславливает тормозные эффекты ГАМК.

В поврежденных нейронах уровень экспрессии NKCC1 растет, а уровень экспрессии KCC2 снижается. Более высокий уровень NKCC1 и более низкий уровень KCC2 приводят к накоплению ионов Cl^- с внутренней стороны мембраны. Открытие ионных каналов, вызванное связыванием ГАМК, таким образом, приводит к оттоку ионов Cl^- из цитоплазмы (в соответствии с градиентом концентрации ионов Cl^-) и деполяризации мембраны. В этом случае воздействие тормозных медиаторов на нейрон приводит не к торможению, а, напротив, к возникновению потенциала действия в мотонейронах и последующему развитию мышечной спастичности. Такое снижение содержания KCC2 было обнаружено не только при повреждении спинного мозга выше поясничной

области [3], но и после аксотомии периферических нервов [13], то есть было связано с нарушением двигательной иннервации скелетных мышц.

Мы предположили, что аналогичный механизм лежит в основе феномена спонтанной тонической активности. Ранее нами было показано [5], что содержание КСС2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга на фоне развивающейся тонической активности камбаловидной мышцы снижается и что внутрибрюшинное введение активатора КСС2 прохлорперазина приводит к устранению спонтанной тонической активности [3, 4, 14]. Полученные нами данные [5] полностью подтверждают вывод Akhter с соавт., что экспрессия КСС2 определяется нервно-мышечной активностью [13].

В настоящем исследовании мы применили новый активатор КСС2 – CLP290, что позволило подтвердить связь спонтанной электрической активности камбаловидной мышцы при разгрузке со снижением экспрессии КСС2 в спинном мозге и исключить возможные артефакты. Мы обнаружили, что внутрибрюшинное введение альтернативного активатора КСС2 – CLP290 на фоне антиортостатического вывешивания, так же как и введение прохлорперазина, предотвращает снижение содержания КСС2 в поясничном отделе спинного мозга. В группе «чистого» 7-суточного вывешивания содержание КСС2 в мотонейронах снизилось на 70% относительно контроля; при этом в группе, в которой вывешивание сочеталось с введением CLP290, содержание КСС2 за тот же период снижалось до уровня 80% от контрольных значений (статистически незначимо). Спонтанная электрическая активность камбаловидной мышцы при этом подавлялась введением CLP290, активирующего экспрессию КСС2. В группе «чистого» антиортостатического вывешивания интегральная ЭМГ-активность камбаловидной мышцы в течение 14 суток возрастала до 90% от контрольной ЭМГ-активности, записанной до вывешивания; в группе с введением CLP290 интегральная ЭМГ-активность за весь период вывешивания не превышала 30% от контроля, статистически значимо отличаясь от «чистого» вывешивания, начиная с третьих суток, что соответствует аналогичному действию прохлорперазина [5]. Из этого следует, что ранее обнаруженное нами при действии прохлорперазина подавление спонтанной электрической активности мышцы обусловлено повышением содержания КСС2 в мотонейронах спинного мозга и не связано с прямым действием прохлорперазина на рецепторы камбаловидной мышцы.

Исходя из того, что наши данные были получены в модели разгрузки, характеризующейся глубоким снижением или полным устранением нервно-мышечной активности камбаловидной мышцы крысы на начальном этапе [1, 3, 9, 10], мы предполагаем, что экспрессия КСС2 поддерживается на определенном уровне до тех пор, пока мотонейроны получают сигналы из иннервируемой мышцы о нормальной активности. Ранее нами было показано, что внутрибрюшинное введение прохлорперазина статистически значимо предотвращало снижение ППС волокон «медленного» типа на фоне 7-суточного вывешивания. В настоящем эксперименте не обнаружено статистически значимых отличий ППС волокон медленного типа в группах антиортостатического вывешивания с введением и без введения CLP290. Из этого следует, что антиатрофический эффект внутрибрюшинного введения прохлорперазина, по-видимому, не имеет прямого отношения к активации КСС2.

В настоящем исследовании был получен ряд новых данных о физиологических эффектах хронического введения CLP290, в частности, о влиянии препарата на спонтанную тоническую активность и морфологические параметры камбаловидной мышцы на фоне антиортостатического вывешивания. Полученные данные дополнили и уточнили представления о воздействии на камбаловидную мышцу сигнальных механизмов, ассоциированных с балансом содержания ионных котранспортеров КСС2/НКСС1 на мембранах мотонейронов. Сравнительный анализ новых и ранее полученных данных позволил выявить изменения, связанные непосредственно с активацией КСС2, исключив эффекты, вызванные неспецифическим действием ранее использовавшегося препарата. Главным образом было показано, что устранение спонтанной то-

нической активности при введении прохлорперазина обусловлено именно изменением в КСС2-зависимом сигналинге и не связано с неспецифическим действием препарата; напротив, антиатрофическое действие прохлорперазина, по-видимому, вызвано прямым действием препарата на мышцу.

Результаты настоящего исследования, таким образом, подтверждают наши представления о влиянии КСС2 на спонтанную тоническую активность *m. soleus* при гравитационной разгрузке и позволяют высказать предположение о возможной зависимости экспрессии КСС2 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга от функциональной активности камбаловидной мышцы.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают глубокую благодарность Маргарите Владимировне Глазовой, заведующей лабораторией Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН за бесценную методическую помощь при подготовке и проведении экспериментов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Б. С. Ш., Т. М. М., В. Е. К.; сбор данных – В. Е. К., С. А. Т., О. В. Т., К. В. С.; обработка данных – В. Е. К., С. А. Т., О. В. Т., К. В. С., написание и редактирование манускрипта – В. Е. К., С. А. Т., Т. М. М., Б. С. Ш.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда, грант № 22–15–00151. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института медико-биологических проблем РАН, протокол № 638 от 18.04.2023 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alford EK, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR (1987) Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp Neurol* 96(3): 635–649. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90225-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90225-1)
2. De-Doncker L, Kasri M, Picquet F, Falempin M (2005) Physiologically adaptive changes of the L5 afferent neurogram and of the rat soleus EMG activity during 14 days of hindlimb unloading and recovery. *J Exp Biol* 208(Pt 24): 4585–4592. <https://doi.org/10.1242/jeb.01931>
3. Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16(3): 302–307. <https://doi.org/10.1038/nm.2107>
4. Edgerton VR, Roy RR (2010) Spasticity: a switch from inhibition to excitation. *Nat Med* 16(3): 270–271. <https://doi.org/10.1038/nm0310-270>

5. Kalashnikov VE, Tyganov SA, Turtikova OV, Kalashnikova EP, Glazova MV, Mirzoev TM, Shenkman BS (2021) Prochlorperazine Withdraws the Delayed Onset Tonic Activity of Unloaded Rat Soleus Muscle: A Pilot Study. *Life* 11(11): 1161.
<https://doi.org/10.3390/life11111161>
6. Сергеева КВ, Шарло КА, Калашников ВЕ, Туртикова ОВ, Тыганов СА, Шенкман БС (2023) Влияние спонтанной нервно-мышечной активности на развитие атрофии камбаловидной мышцы в условиях функциональной разгрузки. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109(10): 1430–1442. [Sergeeva KV, Sharlo KA, Kalashnikov VE, Turtikova OV, Tyganov SA, Shenkman BS (2023) The effect of spontaneous neuromuscular activity on the development of atrophy of the soleus muscle in conditions of functional unloading. *Russ J Physiol* 109(10): 1430–1442. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923100102>
7. Gagnon M, Bergeron MJ, Lavertu G, Castonguay A, Tripathy S, Bonin RP, Perez-Sanchez J, Boudreau D, Wang B, Dumas L, Valade I, Bachand K, Jacob-Wagner M, Tardif C, Kianicka I, Isenring P, Attardo G, Coull JA, De Koninck Y (2013) Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat Med* 19(11): 1524–1528.
<https://doi.org/10.1038/nm.3356>
8. Григорьев АИ, Козловская ИБ, Шенкман БС (2004) Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 90(5): 508–521. [Grigoriev AI, Kozlovskaya IB, Shenkman BS (2004) The role of supporting afferentation in the organization of the tonic muscular system. *Russ J Physiol* 90(5): 508–521. (In Russ)].
9. Kawano F, Ishihara A, Stevens JL, Wang XD, Ohshima S, Horisaka M, Maeda Y, Nonaka I, Ohira Y (2004) Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(1): R76–R86.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00694.2003>
10. Kawano F, Nomura T, Ishihara A, Nonaka I, Ohira Y (2002) Afferent input-associated reduction of muscle activity in microgravity environment. *Neuroscience* 114(4): 1133–1138.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00304-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00304-4)
11. Шенкман БС, Мирзоев ТМ, Козловская ИБ (2020) Тоническая активность и гравитационный контроль постуральной мышцы. *Авиакосм и экол мед* 54(6): 58–72. [Shenkman BS, Mirzoev TM, Kozlovskaya IB (2020) Tonic activity and gravitational control of the postural muscle. *Aerospace and environment med* 54(6): 58–72. (In Russ).
<https://doi.org/10.21687/0233-528X-2020-54-6-58-72>
12. Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61(6): 820–838.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.003>
13. Akhter ET, Griffith RW, English AW, Alvarez FJ (2019) Removal of the Potassium Chloride Co-Transporter from the Somatodendritic Membrane of Axotomized Motoneurons Is Independent of BDNF/TrkB Signaling But Is Controlled by Neuromuscular Innervation. *eNeuro* 6(5): 1–23.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0172-19.2019>
14. Lu Y, Zheng J, Xiong L, Zimmermann M, Yang J (2008) Spinal cord injury-induced attenuation of GABAergic inhibition in spinal dorsal horn circuits is associated with down-regulation of the chloride transporter KCC2 in rat. *J Physiol* 586(23): 5701–5715.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.152348>

An Investigation of the Spontaneous Tonic Activity of the Rat Soleus Muscle Following Hindlimb Suspension, with a Focus on the Effects of Clp290, a Novel Activator of the Spinal Cord Potassium-Chloride Co-Transporter

V.E. Kalashnikov^{a,*}, K.V. Sergeeva^a, O.V. Turtikova^a, S.A. Tyganov^a, T.M. Mirzoev^a, and B.S. Shenkman^a

^aInstitute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**e-mail: vitaliy.kalashnikov@yandex.ru*

The electromyographic activity of the soleus muscle is a reliable indicator of its functional status. Unloading of support causes an immediate cessation of electrical activity in the soleus muscle, which resumes upon restoration of the support load. Prolonged support unloading, however, results in the emergence of spontaneous electrical activity in the soleus muscle. Previous research has established a correlation between this activity and the presence of the potassium-chloride cotransporter (KCC2) on the membranes of spinal cord motor neurons. Additionally, it has been demonstrated that the introduction of the KCC2 activator prochlorperazine can eliminate spontaneous muscle activity. This study aimed to investigate the impact of CLP290, an alternative KCC2 activator, on the spontaneous tonic activity of the rat soleus muscle. The results indicated that daily administration of CLP290 to rats during a 14-day period of hindlimb suspension prevented the reduction in KCC2 levels in the motor neurons of the lumbar spinal cord and the increase in spontaneous tonic activity in the soleus muscle. Notably, there were no significant differences in the cross-sectional area of slow-type fibers between the antiorthostatic suspension groups with and without CLP290 administration.

Keywords: KCC2, prochlorperazine, CLP290, hindlimb suspension, spontaneous muscle activity

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ФОРСИРОВАННОГО ПЛАВАНИЯ НА ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕСТА
«ИЗБАВЛЕНИЕ ПОДНЫРИВАНИЕМ»**

© 2024 г. М. А. Тур¹ *, И. В. Белозерцева¹

*¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова МЗ России, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: striga996@gmail.com*

Поступила в редакцию 30.05.2024 г.

После доработки 15.07.2024 г.

Принята к публикации 23.07.2024 г.

Условия содержания и предшествующий жизненный опыт животных могут в различной степени влиять на области мозга, регулирующие важные нейронные и физиологические функции, такие как память, реакции на стресс и эмоциональное поведение. Стрессоры низкой и средней интенсивности, возникающие в обогащенной окружающей среде и при проведении тренировок, способствуют развитию и поддержанию когнитивных функций, в то время как воздействия чрезмерной силы и/или длительности приводят к дезадаптации и дистрессу, что негативно сказывается на функционировании нервной системы животных в целом и на когнитивных функциях в частности. Опираясь на эти факты, внешние физические воздействия «чрезмерной интенсивности» можно использовать для формирования и изучения различных когнитивных нарушений. В соответствии с этим была выдвинута гипотеза о влиянии схожего, но неизбежного воздействия авersive условий водной среды теста «форсированное плавание» на когнитивные способности животных в тесте «избавление подныриванием». Впервые было оценено влияние стресса форсированного плавания (15 мин) на способность решения задачи теста «избавление подныриванием» и выработку навыка подныривания у крыс. Показано, что наличие опыта неизбежного плавания накануне теста «драматическим» образом сказывается на способности к решению задачи подныриванием, а негативные последствия сохраняются даже по истечении 2 недель.

Использование процедуры форсированного плавания до выполнения теста «избавление подныриванием» выглядит перспективным способом моделирования стресс-индуцированных когнитивных нарушений. Стойкость эффекта неизбежного плавания на скорость решения задачи «избавления подныриванием» (не менее 14 дней) открывает перспективу для оценки эффектов субхронического введения фармакологических средств с антидепрессивными и прокогнитивными свойствами.

Ключевые слова: когнитивные дисфункции, когнитивные способности, избавление подныриванием, экстраполяционное избавление, тест Порсолта, форсированное плавание, крыса

ВВЕДЕНИЕ

Когнитивные способности и их адаптивные реакции в ответ на тот или иной стимул являют собой результат тесного взаимодействия внешних и внутренних факторов. По Крушинскому под когнитивными способностями принято понимать способность животных улавливать закономерности явлений внешнего мира, связывающих предметы и события окружающей среды, и на основании этого выстраивать свое дальнейшее поведение [1]. На такие важные составляющие умственной деятельности у животных, как обучение и запоминание, а также на эмоциональное и психическое состояние и благополучие влияет множество экзогенных и эндогенных факторов. Так, обогащение окружающей среды (предоставление «игрушек» – объектов для исследования, возможности социального взаимодействия и добровольной физической активности) и наличие тренировок (выполнение новых задач и обучение) благотворно влияют на общее состояние животных и их когнитивные способности [2–4], вызывая каскад нейробиохимических событий, приводящих к пластическим изменениям в головном мозге на анатомическом, биохимическом, электрофизиологическом и молекулярном уровнях [5]. На анатомическом и молекулярном уровнях при этом можно наблюдать такие характерные структурные и функциональные изменения, как общее увеличение массы мозга [6–8], увеличение глубины коры больших полушарий (особенно затылочной части) и количества глиальных клеток [9], увеличение размеров тел и ядер нейрональных клеток [10], размера синаптических контактных областей [11], увеличение числа дендритных шипиков на единицу длины базальных дендритов [12], увеличение на 25% и более протяженности и ветвления дендритов [12, 13] и увеличение количества синапсов на нейрон [14]. Эти эффекты предполагают существенное увеличение обрабатывающей способности соответствующих областей коры больших полушарий [15]. Соответственно обедненная окружающая среда и низкий уровень внешних стимулов действуют противоположно на анатомию и биохимию мозга, поведенческие установки и когнитивные возможности индивидуумов [3, 6, 7, 9, 15–17]. Стресс же, в зависимости от его силы, продолжительности и контекста, способен оказывать различное влияние на когнитивные функции и формирование памяти. Краткосрочные эпизоды умеренной интенсивности способны вызывать острое симпатическое возбуждение, усиливающее утилизацию глюкозы в мозге и стимулирующее формирование памяти [18], в то время как слишком сильные по степени воздействия либо чрезмерно продолжительные (хронически повторяющиеся) стимулы (стрессоры) могут привести к дезадаптации организма и дистрессу за счет высокого уровня циркулирующих в крови глюкокортикоидов, которые оказывают воздействие на структуру и функции префронтальной коры, миндалевидного тела [17] и гиппокампа [18] – то есть зоны, формирующие и модифицирующие процесс обучения и запоминания. «Стрессовый» уровень кортизола (у людей) или кортикостерона (у крыс) снижает возбудимость гиппокампа, ингибирует поглощение им глюкозы, вызывает ретракцию дендритов в области СА3 (эффект, связанный с ухудшением эффективности процедуры пространственного обучения), что приводит к снижению эффективности работы данной структуры, изменяет плотность шипиков на апикальных дендритах в области СА1 гиппокампа в зависимости от пола. Слишком сильное и продолжительное воздействие глюкокортикоидов на гиппокамп может иметь нейротоксические эффекты, в том числе необратимые [17, 18]. Также хронический стресс вызывает ретракцию и уменьшение объема префронтальной коры, нарушение синаптической пластичности в соединении гиппокамп – префронтальная кора [19], изменяет лобно-стриарные цепи, которые связаны со стратегиями принятия решений [20]. Эти изменения сопровождаются дефицитом рабочей памяти, поведенческой гибкости и смещением установки внимания [19]. Однако стоит отметить и стимулирующее влияние острого стресса на некоторые аспекты памяти, а именно усиление контекстуального обусловливания страха: улучшение способности животного запо-

минать контекст, связанный со стрессовым стимулом, и стимулировать его научение в дальнейшем (также за счет вовлечения в процесс гиппокампа, миндалевидного тела и префронтальной коры) [17].

У людей наличие в анамнезе воздействия очень длительных, часто повторяющихся и/или слишком сильных стрессоров является провоцирующим фактором развития различных ментальных нарушений, таких как биполярное аффективное расстройство [24], посттравматическое стрессовое расстройство и депрессия [25], когнитивные дефициты пожилых [18]. У лабораторных животных воздействие как хронических, так и острых стрессоров также имеет тенденцию ухудшать воспроизведение пространственных воспоминаний [21, 22].

Известным примером негативного воздействия стрессогенного фактора окружающей среды на организм, приводящим к развитию депрессивноподобного состояния у лабораторных животных, является так называемая модель «поведенческого отчаяния» – Behavioural despair test или forced swimming/swim test в модификации по Porsolt [27]. Это широко распространенный водный тест, разработанный еще в 1977 г., в основе которого лежит реакция грызуна на угрозу утопления. При стандартной схеме проведения он включает в себя 2 сессии: с экспозицией 15 мин в первый день и одну 5-минутную во второй день. Как правило, на вторую сессию активность животных сильно снижается: они делают меньше попыток выбраться из цилиндра или исследовать его, проводят большую часть времени в пассивном дрейфовании. Классической интерпретацией такого поведения является развитие депрессивноподобного состояния, что имеет свое фармакологическое подтверждение: крысы, получавшие антидепрессанты накануне теста, плавают активнее, чем контрольные животные, совершают больше попыток выбраться и активнее исследуют окружающую обстановку [28]. Другой распространенной интерпретацией снижения активности на вторую сессию является формирование стратегии положительной поведенческой адаптации, позволяющей меньше утомляться и сохранить больше энергии и тепла: животное привыкает к воспроизводимым идентичным условиям теста и просто дожидается его окончания [29]. На сегодняшний день вопрос, является ли пассивная стратегия поведения крыс в тесте «Форсированное плавание» проявлением депрессивноподобного состояния, остается дискуссионным.

Другой, не столь известный, но также стрессогенный водный тест – тест «избавление подныриванием» (water escape test). Изначально его описал Henderson еще в 1970 г. [30] как один из методов оценки реакций страха и эмоционального статуса животных. В отличие от появившегося спустя 7 лет теста Порсолта, тест Хендерсона не получил широкого распространения, однако по прошествии времени этот метод в модификации Бондаренко [31] был признан отечественной экспериментальной фармакологией и внесен в «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» как тест «Экстраполяционное избавление» для выявления соединений с нейрореплетической активностью [32] и изучения влияния фармакологического (антигипертензивного) средства на психоэмоциональное состояние и когнитивную функцию [33]. В нашей работе мы будем использовать в качестве названия теста «избавление подныриванием», поскольку придерживаемся мнения, что название не должно содержать элементы интерпретации результатов, а лишь кратко описывать объективно совершаемое действие.

Цель исследования – оценить значимость предшествующего негативного опыта неизбежного плавания на решение задачи теста «избавление подныриванием». Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) сравнить поведение интактных крыс в тесте «избавление подныриванием» с поведением крыс, имеющих опыт форсированного плавания; 2) определить максимальную длительность интервала между тестами, при которой сохраняется значимое влияние форсированного плавания на выполнение задачи теста «избавление подныриванием».

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на половозрелых (3–4 месяца) самцах крыс стока Wistar массой 345 ± 5 г ($n = 50$) из локальной колонии отдела психофармакологии Института фармакологии им. А. В. Вальдмана, берущей свое начало от животных питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург, Россия). Крыс содержали группами по 3–5 особей в прозрачных полисульфоновых клетках TIV (Tecniplast, Италия) со свободным доступом к полнорационному комбикорму (ООО «Лабораторкорм», Россия) и фильтрованной («Аквафор», Россия) водопроводной воде. В помещении для содержания животных поддерживали световой цикл (12 ч свет/12 ч темнота, включение света в 9:00 ч), температуру ($20\text{--}24$ °C) и относительную влажность воздуха ($50 \pm 20\%$). В качестве подстилочного материала использовали гранулы фракции 4–6 мм, изготовленные из стержневой части початков кукурузы (ООО «ЗКК «Золотой початок», Россия). Основания клеток, подстилочный материал и бутылочки с водой меняли 2 раза в неделю.

Для оценки влияния опыта форсированного плавания на выполнение теста «избавление подныриванием» использовали 6 независимых групп крыс (табл. 1).

Таблица 1. Экспериментальные группы

Название группы	Обозначение	Интервал между процедурой и тестом (дни)	Количество животных (n)
Контрольная группа	GC	–	12
Группа 1	G1	1	7
Группа 3	G3	3	8
Группа 5	G5	5	8
Группа 7	G7	7	7
Группа 14	G14	14	8

Процедуру «Форсированное плавание» выполняли в течение 15 мин для получения крысами опыта неизбежного плавания. Использовали четыре цилиндра, изготовленных из органического стекла ($d = 20$ см; $h = 45$ см), заполненных водой (24.0 ± 0.5 °C) до глубины 30 см (рис. 1а) и отделенных друг от друга непрозрачными перегородками. После процедуры крыс аккуратно вынимали из цилиндра, вытирали индивидуальным полотенцем во избежание пагубного влияния гипотермии на состояние животных [40] и помещали в клетку с чистым подстилом и бумажными салфетками. После каждого животного для устранения ольфакторных «сигналов тревоги» [34] мыли цилиндры и заполняли их свежей водой.

Тест «Избавление подныриванием» при повторных выполнениях позволяет проанализировать индивидуальные различия стиля решения задачи, скорость научения и оценить сохранность навыка у крыс. В работе использовали собственную модификацию экспериментальной установки, которая в отличие от коммерческого варианта (ООО «НПК Открытая наука»), существовавшего на момент выполнения исследования, была дополнена вертикальной лестницей, позволяющей крысе самостоятельно выбраться из «большого» бассейна на прозрачную крышку (табл. 2, рис. 1б), исключая таким образом не учитываемый в эксперименте стресс от захвата животного в воде рукой экспериментатора.

Таблица 2. Параметры установки для выполнения теста «Избавление подныриванием», созданной в отделе психофармакологии Института фармакологии им. А. В. Вальдмана

Емкость резервуара для воды	$H = 38.5 \text{ см}; \varnothing = 35 \text{ см}$
Заполнение водой	$H = 20 \text{ см}; T = 24.0 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Размер центрального цилиндра и глубина его погружения	$H = 22.5 \text{ см}; \varnothing = 10 \text{ см}; 2.5 \text{ см}$
Приспособление для выхода	Металлическая лестница – $11.5 \text{ см} \times 38.5 \text{ см}$
Место выхода	Отверстие в прозрачной крышке основного резервуара – $\varnothing = 7 \text{ см}$

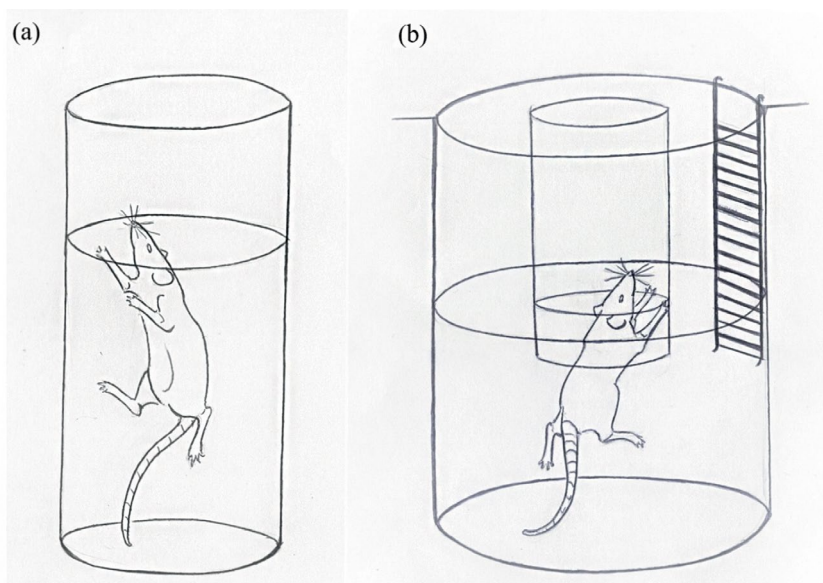


Рис. 1. Схемы экспериментальных установок для выполнения процедуры «форсированное плавание» (а) и теста «избавление подныриванием» (б).

Крысу помещали в центральную трубку установки ногами вниз, и ее поведение записывали на видеокамеру в течение 3 мин или до появления животного на крышке установки. Поведение оценивали в 3 последовательных (с интервалом в 15 мин) экспериментальных сессиях, подсчитывая после каждой сессии количество оставленных животным фекальных болюсов. Замену воды производили после каждой крысы во избежание воздействия ольфакторных сигналов тревоги, оставленных сородичами [34]. Далее по видеозаписям проводили регистрацию поведения с помощью программы Ethograph (версия 2.07, РИТЕК, Санкт-Петербург, Россия) и в качестве основного показателя вычисляли латентные периоды (ЛП) подныривания под стенку центрального цилиндра.

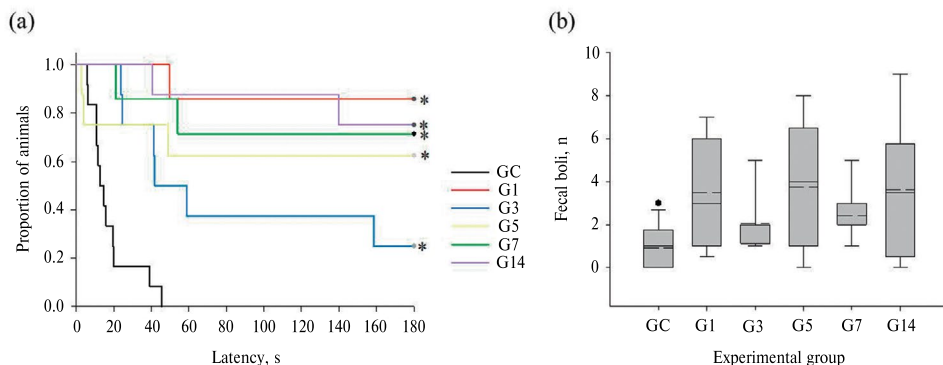


Рис. 2. Скорость решения задачи теста «избавление подныриванием» через разные временные интервалы после стрессирования форсированным плаванием (а) и количество оставленных животными фекальных болюсов (б). (а) распределение длительности латентных периодов подныривания представлено в виде кривых Каплана – Майера. Максимальная длительность теста – 3 мин. * $p < 0.05$ значимые отличия от контрольной группы по тесту Holm – Sidak.

(б) данные представлены в виде диаграмм размаха: нижняя и верхняя границы «ящиков» соответствуют 25-му и 75-му процентилю, пересекающие их линии отражают медиану (сплошная линия) и среднее значение (пунктирная линия), а «усы» – 10-й и 90-й процентиля. Результаты измерений, выделяющиеся из общей выборки (выбросы), изображены в виде точек за пределами «усов» диаграммы.

Экспериментальные группы: GC – контроль (интактные) и имеющие предшествующий тесту «избавление подныриванием» опыт форсированного плавания за 1 суток – G1; 3 суток – G3; 5 суток – G5; 7 суток – G7; 14 суток – G14. $n = 7-12$.

Графическое представление данных и их статистический анализ выполнены с использованием пакета программ SigmaPlot (версия 12.5, Systat Software Inc., США). Для сравнения ЛП наступления оцениваемой реакции (подныривания) использовали анализ выживаемости Каплана – Майера, позволяющий принимать во внимание цензурированные данные [35], то есть учитывать показатели животных, поведенческая реакция которых не происходила до окончания теста. Данные по количеству фекальных болюсов, оставленных животными в экспериментальной установке, проверяли на нормальность распределения (тест Шапиро – Уилка) и равенство дисперсий. Далее их ранжировали и выполняли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Решение задачи теста «Избавление подныриванием»

Анализ выживаемости Каплана – Майера показал, что при первой посадке в установку (решение задачи избавления от авersive условий) распределение ЛП подныривания у интактных животных (GC) значительно отличалось от такового во всех группах (Log-Rank test – 47.93; $df = 5$; $p < 0.001$). Все контрольные животные успешно решили задачу теста в течение первой минуты, тогда как 90% крыс, получивших накануне процедуру форсированного плавания (G1), так и не смогли ее решить до окончания теста. Скорость решения в остальных экспериментальных группах была несколько выше, чем в G1, однако сохранялись значимые отличия от аналогичного показателя контрольной группы (рис. 2а). Выполненный на рангах однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил значимое влияние фактора «группа животных» на количество остав-

ленных в экспериментальной установке фекальных болюсов ($F(5,44) = 2.53$; $p = 0.042$), однако межгрупповые различия не достигали уровня значимости (рис. 2b). Количество болюсов обычно считают показателем эмоционального состояния животных (тревожности), однако в случае, когда время пребывания животных в установке различается, такое утверждение не представляется абсолютно корректным.

Формирование навыка подныривания

Формирование навыка подныривания оценивали по результатам 2-й и 3-й экспериментальных сессий. У интактных крыс (GC) изменение длительности ЛП подныривания от сессии к сессии не достигло уровня значимости (Log-Rank test – 5.19; $df = 2$; $p = 0.075$; рис. 3a). Однако в данной группе более половины животных (7 из 12) изначально имели ЛП менее 15 с, при этом во вторую посадку 2 крысы из данной группы так и не поднырнули под стенку центрального цилиндра.

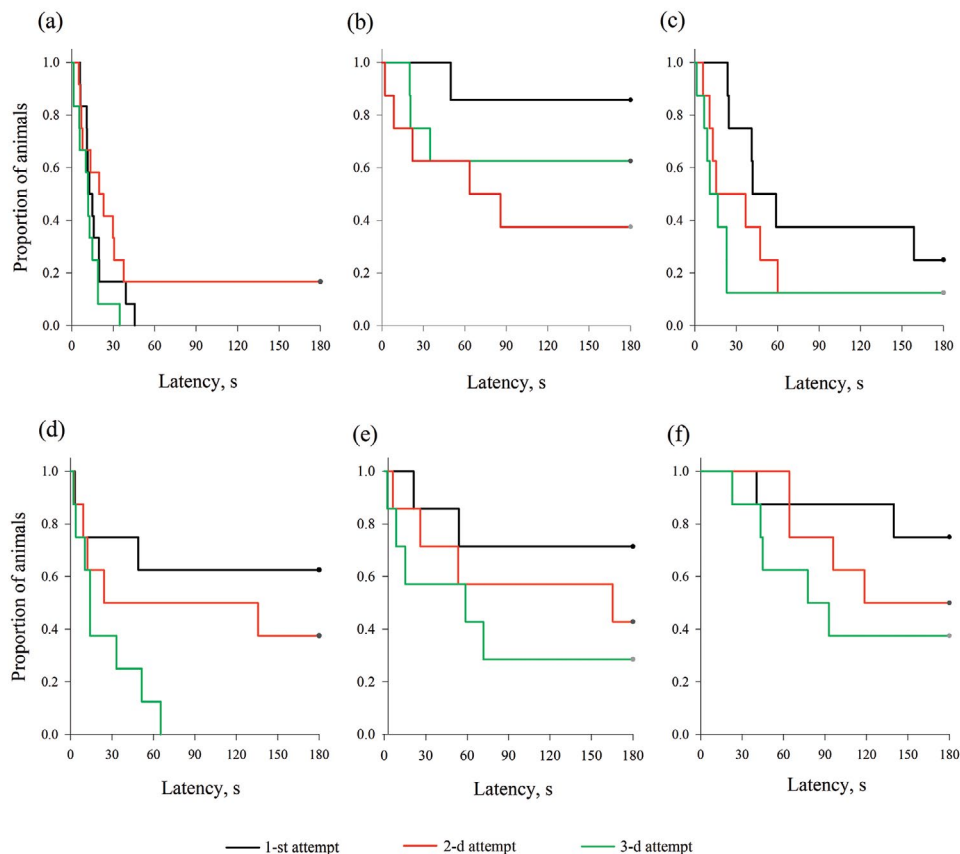


Рис. 3. Формирование навыка подныривания у интактных крыс (a) и имеющих опыт форсированного плавания: за 1 (b), 3 (c), 5 (d), 7 (e) и 14 (f) суток до выполнения теста. Распределение длительности латентных периодов подныривания представлено в виде кривых Каплана – Майера. Максимальная длительность теста – 3 мин. $n = 7-12$.

Крысы, имеющие опыт 15-минутного форсированного плавания за 1–14 суток до теста «избавление подныриванием», имели значимо более длительный базовый (1 посадка) ЛП подныривания, чем контрольные животные, относительно которого сокращение показателя могло быть более выраженным. Однако значимость фактора «посадка» была выявлена лишь в G5 (рис. 3d; Log-Rank test – 6.08; $df = 2$; $p < 0.05$), при этом статистически значимых различий между посадками обнаружено не было. В остальных группах (рис. 3b – c, f) анализ выживаемости Каплана – Майера не показал различий ЛП подныривания при оценке формирования навыка (Log-Rank test для G1 – 3.487; $df = 2$; $p = 0.18$; для G3 – 4.24; $df = 2$; $p = 0.12$; для G7 – 2.61; $df = 2$; $p = 0.27$; для G14 – 2.83; $df = 2$; $p = 0.24$).

При сравнении ЛП подныривания при 3-й посадке животных в установку было выявлено влияние фактора «группа» (Log-Rank test – 21.20; $df = 5$; $p < 0.001$), однако от показателей контроля значимо отличалась только G14.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно данным литературы, получаемый от стандартной процедуры «форсированного плавания» стресс не меняет поведение животных кардинальным образом: он недостаточно жесткий, чтобы повлиять на предпочтение крысами раствора сахара («экспериментальный» критерий ангедонии – одного из основных клинических симптомов депрессии), не изменяет поведение гнездостроения и не влияет на подвижность в тесте «Открытое поле» [39]. Научная ассоциация лабораторных животных (Research UA), Физиологическое общество, Британская ассоциация психофармакологии (Psychopharmacology BAf) и ассоциация специалистов по лабораторным животным (LASA) классифицирует степень тяжести данного теста как «умеренную» [40]. Основным наблюдаемым негативным эффектом у животных является гипотермия, степень выраженности которой зависит от температуры воды [40]. Между тем известно, что через 20 мин после форсированного плавания (в зависимости от условий – температуры воды, глубины заполнения, уровня освещенности, фазы светового цикла [41, 42]) в сыворотке крови крыс значительно (до 437% от базального показателя [42]) повышается уровень кортикостерона – основного гормона стресса, который в высоких концентрациях может негативно влиять на формирование долговременной памяти [18].

Результаты выполненного исследования свидетельствуют о том, что стрессирующее воздействие форсированного плавания (15 мин) негативно сказывается на решении задачи теста «избавление подныриванием» и в меньшей степени на формировании у крыс навыка подныривания. Наличие аверсивного опыта принудительного плавания не только уменьшает склонность животных к проактивному стилю преодоления трудностей [36], отражающегося увеличением иммобильности во второй и последующих посадках в аналогичных условиях [37], но и снижает когнитивную гибкость животных, зависящую от функционирования префронтальной коры мозга. У крыс уменьшается способность выстраивать эффективную стратегию поведения в конкретной ситуации (экстраполировать). При этом значимое влияние опыта форсированного плавания на способность крыс решать задачу теста «избавления подныриванием» сохраняется как минимум в течение 2 недель.

При оценке обучения у крыс опытных групп G1 – G14 не было обнаружено значимых изменений ЛП подныривания от посадки к посадке за исключением группы G5. Формирование навыка, оцениваемого по сокращению ЛП подныривания, у животных контрольной группы также не было выявлено, что скорее всего связано с весьма коротким ЛП уже при первой посадке. Зафиксировать обучение животных, изначально решающих задачу теста практически на пределе физических возможностей, весьма проблематично. Отсутствие изменений скорости решения задачи в экспериментальных группах (кроме группы G5) с очень длительным базовым ЛП подныривания, на

наш взгляд, свидетельствует о замедлении обучения животных, ранее прошедших процедуру форсированного плавания. Стоит также отметить, что все интактные крысы выполняли задачу теста при первой посадке, однако далее обучение навыку у 6 животных в группе GC пошло через «ухудшение», при этом 2 крысы так и не поднырнули в течение отведенных 3 мин. Такой стиль обучения описан для лабораторных грызунов [38]. Можно предположить, что животное, попадая в уже знакомую обстановку, испытает меньше страха, и у него появляется исследовательская активность, которая при третьей посадке уже угасает. Паттерн формирования навыка подныривания через «ухудшение» (с увеличением длительности ЛП подныривания во 2-ю посадку) упоминается также у Бондаренко, которая считает, что увеличение ЛП во вторую посадку происходит из-за формирования неспецифической сенситизации к аверсивным факторам среды: увеличение уровня возбуждения при повторной посадке (по закону Йеркса – Додсона) негативно отражается на способности животного к решению поставленной задачи теста [38]. У животных из групп G1 – G14 не было обнаружено обучения через «ухудшение», что, возможно, связано с наличием у них опыта неизбежного пребывания в аналогичных аверсивных условиях водной среды.

Негативное влияние на решение поставленной задачи, скорее всего, дополнительно усиливается схожими контекстуальными условиями (водной средой, температурой воды и ограниченностью пространства), в результате чего повышается уровень эмоциональных переживаний, который отрицательно воздействует на решение задачи. Индексом эмоциональности традиционно считается количество оставленных животными при выполнении тестов фекальных болюсов. Выявленная значимость эффекта на данный показатель длительности интервала между форсированным плаванием и тестом «избавление подныриванием» может свидетельствовать о более высоком уровне тревожности у стрессированных самцов крыс, однако нельзя исключать факт влияния более длительного пребывания в водном резервуаре животных, не способных решить задачу теста.

Мы полагаем, что снижение способности к решению задачи теста «избавление подныриванием» при сочетании его с процедурой «форсированного плавания» может являться маркером когнитивных нарушений и послужить основой для разработки новых моделей стресс-индуцированных когнитивных дисфункций. Стойкость эффекта воздействия (не менее 14 дней) открывает перспективу для субхронического введения фармакологических средств с антидепрессивными и прокогнитивными свойствами. Стоит отметить, что в случае оценки эффектов соединений, влияющих на формирование памяти, могут быть получены ложнопозитивные результаты точно так же, как и при использовании 2-дневной парадигмы теста «форсированное плавание». С учетом технических характеристик обоих методов (относительная быстрота и простота исполнения) данное сочетание может стать экспресс-методом для продуктивного скрининга лекарственных средств.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Т. М. А. – выполнение экспериментов, сбор и обработка данных, обсуждение результатов и написание статьи; Б. И. В. – идея исследования, конструирование экспериментальной установки, планирование эксперимента, обработка данных, обсуждение результатов и редактирование статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств федерального бюджета на проведение Госзадания (2018–2020 гг.) по теме: «Разработка и фармакологическая валидация экспериментальных моделей нейроповеденческих расстройств» (рег. № АААА-ЖА18-118070690064-0). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, протокол № 100_ИФ1_1218/21_300.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Перепелкина ОВ, Лил'я ИГ, Маркина НВ, Голибродо ВА, Полетаева ИИ* (2021) Первый опыт селекции лабораторных мышей на высокую способность к экстраполяции. В кн: Формирование поведения животных в норме и патологии: К 100-летию со дня рождения ЛВ Крушинского (1911–1984). М. Языки славянских культур. 263–296. [*Perepelkina OV, Lil'p IG, Markina NV, Golibrodov VA, Poletaeva II* (2021) The first experience of selection of laboratory mice for a high ability to extrapolate. In: Formation of Animal Behavior in Health and Disease: to the 100th Anniversary of the Birth of LV Krushinsky (1911–1984). Moscow. Yazyki Slavyanskikh Kul'tur. 263–296. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/s1607672921040116>
2. *Gelfo F* (2019) Does Experience Enhance Cognitive Flexibility? An Overview of the Evidence Provided by the Environmental Enrichment Studies. *Front Behav Neurosci* 13:150.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00150>
3. *Rosenzweig MR, Bennett EL* (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 78(1):57–65.
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00216-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00216-2)
4. *Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL* (1962) Relations between brain chemistry and problem-solving among rats raised in enriched and impoverished environments. *J Compar Physiol Psychol* 55(5):801–807.
<https://doi.org/10.1037/h0044220>
5. *Hirase H, Shinohara Y* (2014) Transformation of cortical and hippocampal neural circuits by environmental enrichment. *Neuroscience* 280:282–298.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.031>
6. *Rosenzweig MR* (1966) Environmental complexity, cerebral change and behavior. *Am Psychol* 21(4):321–332.
<https://doi.org/10.1037/h0023555>
7. *Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC* (1969) Rat brain: effects of environmental enrichment on wet dry weights. *Science* 163(3869):825–826.
<https://doi.org/10.1126/science.163.3869.825>
8. *Ferchmin PA, Eterovic VA, Caputto R* (1970) Studies on brain weight and RNA content after short periods of exposure to environmental complexity. *Brain Res* 20(1):49–57.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90153-8)
9. *Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR* (1964) The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J Compar Neurol* 123(1):111–119.
<https://doi.org/10.1002/cne.901230110>
10. *Diamond MC* (1967) Extensive cortical depth measurements and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats. *J Compar Neurol* 131(3):357–364.
<https://doi.org/10.1002/cne.901310305>
11. *West RW, Greenough WT* (1972) Effects of environmental complexity on cortical synapses of rats: Preliminary results. *Behav Biol* 7(2):279–284.
[https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(72\)80207-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(72)80207-4)
12. *Globus A, Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC* (1973) Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Compar Physiol Psychol* 82(2):175–181.
<https://doi.org/10.1037/h0033910>
13. *Greenough WT, Volkmar FR* (1973) Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp Neurol* 40(2):451–504.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(73\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0014-4886(73)90090-3)

14. *Turner AM, Greenough WT* (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Res* 329(1–2):195–203.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90525-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90525-6)
15. *Rosenzweig MR, Love W, Bennett EL* (1968) Effects of a few hours a day of enriched experience on brain chemistry and brain weights. *Physiol Behav* 3(6):819–825.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(68\)90161-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(68)90161-3)
16. *Denenberg VH, Morton JR, Haltmeyer GC* (1964) Effect of social grouping upon emotional behaviour. *Animal Behav* 12(2–3):205–208.
[https://doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(64)90001-6)
17. *Bangasser DA, Shors TJ* (2010) Critical brain circuits at the intersection between stress and learning. *Neurosci Biobehav Rev* 34(8):1223–1233
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.02.002>
18. *McEwen BS, Sapolsky RM* (1995) Stress and cognitive function. *Current Opin Neurobiol* 5(2):205–216
[https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80028-X](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80028-X)
19. *Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OFX, Jay TM, Sousa N* (2007) The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27(11):2781–2787.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4372-06.2007>
20. *Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ, Costa RM, Sousa N* (2009) Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science* 325(5940):621–625.
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1171203>
21. *Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BC* (1996) Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci* 110(6):1321–1334.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.110.6.1321>
22. *Diamond DM, Park CR, Heman KL, Rose GM* (1999) Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. *Hippocampus* 9:542–552.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:5<542::AID-HIPO8>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:5<542::AID-HIPO8>3.0.CO;2-N)
23. *Ferchmin PA, Eterovic VA* (1970) Caputto R. Studies on brain weight and RNA content after short periods of exposure to environmental complexity. *Brain Res* 20(1):49–57.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90153-8)
24. *Czeh B, Lucassen PJ* (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatr Clin Neurosci* 257:250–260.
<https://doi.org/10.1007/s00406-007-0728-0>
25. *De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F* (2005) Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 6:463–475.
<https://doi.org/10.1038/nrn1683>
26. *Pariante CM, Lightman SL* (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31(9):464–468.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006>
27. *Porsolt RD, Pichon M, Jalfre M* (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730–732.
<https://doi.org/10.1038/266730a0>
28. *Detke MJ, Rickels M, Lucki I* (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121(1):66–72.
<https://doi.org/10.1007/BF02245592>
29. *Borsini F, Meli A* (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* 94(2):147–160.
<https://doi.org/10.1007/BF00176837>
30. *Henderson N* (1970) Behavioral reactions of wistar rats to conditioned fear stimuli, novelty, and noxious stimulation. *J Psychol: Interdisciplin and Applied* 75:19–34.
<https://doi.org/10.1080/00223980.1970.9916801>
31. *Бондаренко НА* (1980) Зависимость реализации поведения избавления из острой стрессогенной ситуации от типологической принадлежности животных. Депонир ВИНТИ 2038. [*Bondarenko NA* (1980) Relationship between escape behavior from acute stress and animal typological traits. Deponor VINITI 2038. (In Russ)].
32. *Островская РУ, Раевский КС, Воронина ТА, Гарибова ТЛ, Ковалев ГИ, Кудрин ВС, Наркевич ВБ, Клодт ПМ* (2012) Методические рекомендации по изучению нейролептической активности лекарственных средств. В кн: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ред АН Миронов. М. Гриф и К. 251–264. [*Ostrovskaya RU, Raevskii KS, Voronina TA, Garibova TL, Kovalev GI, Kudrin VS, Narkevich VB, Clodt PM* (2012) Methodological recommendations for studying the neuroleptic activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Ed AN Mironov. M. Grif and K. 251–264. (In Russ)].

33. Петров ВИ, Медведев ОС, Тюренков ИН, Мурашев АН (2012) Методические рекомендации по изучению гипотензивной активности лекарственных средств. В кн: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ред АН Миронов. М. Гриф и К. 363–375. [Petrov VI, Medvedev OS, Turenkov IN, Murashev AN (2012) Guidelines for studying the antihypertensive activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Ed AN Mironov. M. Grif and K. 363–375. (In Russ)].
34. Abel EL, Bilitzke PJ (1990) A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav* 48(2):233–239.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90306-O](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90306-O)
35. Rowland DL, Thornton JA (2001) Testing and analytical procedures for laboratory studies involving nonresponders during a limited observation period: An illustration using male sexual behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 68(3):403–409.
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00473-1](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00473-1)
36. Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Veegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MAW, Blokhuis HJ (1999) Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 23(7):925–935.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)
37. Armario A (2021) The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits. *Neurosci Biobehav Rev* 128:74–86.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.014>
38. Бондаренко НА (2014) Индивидуальные различия поведения крыс в тесте «Экстраполяционное извлечение»: возможность выявления «тревожного» фенотипа. Тез Всеросс конф Инновации в фармакологии: от теории к практике. СПб. Альта Астра. 28–30. [Bondarenko NA (2014) Individual differences in rat behavior in the “Extrapolation Escape Task” test: possibility to reveal the “anxious” phenotype. Abstract Conf Innovations in Pharmacology: From Theory to Practice. Saint-Petersburg. Alta Astra. 28–30. (In Russ)].
39. Becker L, Mallien AS, Pfeiffer N, Brandwein C, Talbot SR, Bleich A (2023) Evidence-based severity assessment of the forced swim test in the rat. *PLoS One* 18(10): e0292816.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816>
40. The forced swim test. Oct 162020: <https://www.lasa.co.uk/the-forced-swim-test/>.
41. Verma P, Hellemans KG, Choi FY, Yu W, Weinberg J (2010) Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. *Physiol Behav* 99(3):276–285.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.11.002>
42. Drossopoulou G, Antoniou K, Kitraki E, Papathanasiou G, Papalexi E, Dalla C, Papadopoulou-Daifoti Z (2004) Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience* 126(4):849–857.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.044>
43. Белозерцева ИВ, Драволина ОА, Тур МА (2014) Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им ИП Павлова. Ред ЭЭ Звартау. СПб. Изд-во СПбГМУ. [Belozertseva IV, Dravolina OA, Tur MA (2014) Guidelines for the use of laboratory animals for scientific and educational purposes at the IP Pavlov St. Petersburg State Med Univ. (Ed) EE Zvartau. SPB. Publ House of St Petersburg State Med Univer. (In Russ)].

Effect of Forced Swimming on the Performance of the "Water Escape Test"**M. A. Tur^{a,*}, and I. V. Belozertseva^a***^aFirst St. Petersburg Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia***e-mail: striga996@gmail.ru*

Housing conditions and prior life experiences can influence, to varying degrees, animal behavior, brain regions that regulate important neural and physiological functions such as memory, stress responses, and emotional behavior. Stressors of low to moderate intensity, occurring in enriched environments and training, promote the development and maintenance of cognitive functions, whereas exposures of excessive severity and/or duration lead to maladaptation and distress, with negative effects on animal nervous system functioning in general and cognitive functions in particular. Based on these facts, external physical effects of "excessive intensity" can be used for the formation and study of various cognitive disorders. Accordingly, it was hypothesized that a similar but unavoidable exposure to the aversive conditions of the aquatic environment of the "forced swim" would affect the cognitive ability of animals in the "water escape" test. For the first time the effect of forced swimming stress (15 min) on the ability to solve the task of the "water escape" test and the development of the diving skill was evaluated. It was shown that the experience of forced swimming on the eve of the test has a "dramatic" effect on the ability to solve the task of diving, and the negative effects persist even after 2 weeks. The use of the forced swim procedure before performing the "water escape" test looks like a promising way to model stress-induced cognitive dysfunctions. The persistence of the effect of forced swimming on the "water escape" test task completion (at least 14 days) opens the prospect for evaluating the effects of subchronic administration of pharmacological agents with antidepressant and procognitive properties.

Keywords: cognitive dysfunction, cognitive ability, water escape test, extrapolative escape, Porsolt test, forced swim test, rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭКСПРЕССИЯ ЭФФЕКТОРОВ АПОПТОЗА, АУТОФАГИИ
И НЕКРОПТОЗА В КЛЕТКАХ ГИППОКАМПА КРЫС
ПОСЛЕ ИЗБЫТОЧНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ F⁻**

© 2024 г. О. В. Надей¹, Н. И. Агалакова^{1, *}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,

Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: nagalak@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2024 г.

После доработки 02.08.2024 г.

Принята к публикации 04.08.2024 г.

В работе исследовали экспрессию маркеров апоптоза, аутофагии и некроптоза в клетках гиппокампа крыс после длительного потребления избыточных доз F⁻ на уровне транскрипции и трансляции. Самцы крыс Wistar были разделены на 4 группы, получавшие 0.4 (контроль), 5, 20 и 50 мг/л F⁻ (в виде NaF) в течение 12 месяцев. Изменения содержания эффекторов митохондриального (Bcl-2, Bax, каспазы-9, каспазы-3) и рецепторного (каспазы-8, Fas) путей апоптоза, посредников (Ulk-1, Beclin-1) и модуляторов (AMPK, Akt, mTOR) аутофагии, а также некроптоза (RIP и MLKL) в клетках оценивали методом иммуноблоттинга, экспрессию генов (*Bcl2*, *Bax*, *Casp3*, *Ulk1*, *Beclin1*, *Prkaa1*, *Akt* и *mTor*) – методом ПЦР в реальном времени. В гиппокампе животных, подвергавшихся действию F⁻, снижалось соотношение экспрессии генов *Bcl2/Bax* и белков Bcl-2/Bax, активировались каспаза-9 и каспаза-3, однако уровень каспазы-8 и мембранного рецептора Fas оставался стабильным. Длительное потребление F⁻ не оказало влияния на содержание инициаторного белка аутофагии Ulk-1 и протеинкиназы AMPK, Akt и mTOR, но привело к ингибированию ключевого посредника аутофагии Beclin-1. Уровни экспрессии эффекторов некроптоза RIP и MLKL также не изменялись в клетках гиппокампа крыс, получавших избыток F⁻. Таким образом, длительное воздействие F⁻ сопровождалось активацией апоптоза, преимущественно по митохондриальному пути, на фоне подавления аутофагии.

Ключевые слова: крыса, гиппокамп, ионы фтора, апоптоз, аутофагия, некроптоз

DOI: 10.31857/S0869813924090062, EDN: AJZMRG

ВВЕДЕНИЕ

Соединения фтора (F) очень широко распространены в окружающей среде вследствие выброса в атмосферу и воду из природных и антропогенных источников [1, 2]. В регионах, где концентрация F⁻ в воде, доступной для повседневного использования населением, превышает предельно допустимый уровень (1.5 мг/л), проживают около 300 миллионов человек. Такие регионы есть и на территории России [3]. За исключением чая и морской рыбы, содержание F⁻ в пищевых продуктах незначительно, поэтому основным путем его поступления в организм человека и животных является вода

[2, 4, 5]. В развитых странах большой вклад в потребление F⁻ человеком вносит его намеренное добавление в питьевую воду, молоко, соль, а также стоматологическую продукцию и препараты для лечения остеопороза [1, 4, 6]. Случаи хронических или острых отравлений F⁻ регистрируются на промышленных предприятиях по производству металлов, топлива и удобрений, на сельскохозяйственных предприятиях, интенсивно применяющих пестициды и фосфатные удобрения, при использовании угля для отопления и чистящих средств в быту. В результате поступление F⁻ в организм может быть бесконтрольным и приводить к развитию флюороза – дегенеративного заболевания зубной и костной тканей [4, 7].

Однако в последние десятилетия появилось достаточно много работ о негативном влиянии F⁻ на другие системы организма, в том числе о патологических изменениях в ЦНС. Обладая способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, F⁻ накапливается в различных отделах мозга и провоцирует множество неврологических и когнитивных расстройств [8–10]. Клинические обследования населения, проживающего в районах эндемического флюороза, выявили изменения локомоторной активности, ухудшение памяти и интеллектуальных способностей у взрослых, нарушение формирования памяти, дефицит абстрактного мышления и снижение среднего уровня IQ у детей. В тканях мозга экспериментальных животных, подверженных воздействию F⁻, были описаны многочисленные патологические процессы, в частности, нарушение синаптической передачи вследствие изменения синтеза нейротрансмиттеров, активности синаптических белков и молекул внутриклеточных сигнальных каскадов, участвующих в процессах формирования памяти, экспрессии транскрипционных и нейротрофических факторов, необходимых для поддержания жизнеспособности и функционирования нейронов, и повреждения структурных компонентов цитоскелета [8–10]. Все это ставит под сомнение необходимость широкого применения фтора для профилактики заболеваний зубов и показывает необходимость пересмотра его предельно допустимых доз.

В наших предыдущих работах в гиппокампе крыс, потреблявших избыточные дозы F⁻ в течение длительного времени, были выявлены снижение когнитивных способностей, активация Ca²⁺-зависимых сигнальных молекул, патоморфологические изменения и снижение численной плотности нейронов [11, 12]. Процессы гибели нейронов строго регулируются сложной сетью сигнальных путей, активирующихся в ответ на множество стрессовых стимулов и включающих изменения экспрессии генов и активности цитоплазматических белков-посредников [13, 14]. Ранее было описано, что патологические изменения, наблюдающиеся в тканях мозга при различных нейродегенеративных заболеваниях, запускают несколько разных механизмов гибели клеток, включая апоптоз, аутофагию и некроптоз [14–17]. Какой путь гибели будет активироваться в данных конкретных условиях, зависит от типа и интенсивности стрессового воздействия и соотношения активности внутриклеточных посредников различных сигнальных каскадов. Поэтому в данном исследовании были проанализированы изменения экспрессии инициаторов и эффекторов различных путей гибели клеток: митохондриального (Bax, Bcl-2, каспазы-9, каспазы-3) и рецепторного (каспазы-8, Fas) путей апоптоза, аутофагии (AMPK, Akt, mTOR, Ulk-1, Beclin-1) и некроптоза (MLKL, RIP) в клетках гиппокампа крыс после длительного потребления F⁻.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Для работы использовали 40 самцов крыс Wistar, полученных из вивария Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Животные содержались в стандартных условиях с температурой воздуха 22–25 °C и циклом освещения/темнота 12 ч/12 ч, получая корм из натуральных ингредиентов с низким содержанием F⁻ и воду *ad libitum*.

В 6-недельном возрасте крысы были произвольно разделены на 4 группы по 10 особей в каждой. Животные из контрольной группы получали обычную воду с фоновым содержанием 0.2–0.4 мг F⁻/л. Крысам из других групп добавляли в воду 5 мг F⁻/л (11.05 мг NaF/л воды), 20 мг F⁻/л (44.2 мг NaF/л) и 50 мг F⁻/л (110.5 мг NaF/л). Длительность эксперимента составила 12 месяцев. Дозы NaF, выбранные для работы, позволили получить такие уровни F⁻ в плазме крови крыс [18], которые сопоставимы с концентрациями F⁻ в плазме крови людей, потребляющих воду с содержанием F⁻ в диапазоне оптимальной и предельно допустимой концентраций (5 мг/л) или проживающих в регионах эндемического флюороза (20 и 50 мг/л) [19], учитывая более высокую (в среднем в 5 раз) скорость выведения F⁻ из организма крыс.

Крыс выводили из эксперимента рассечением брюшной аорты после внутрибрюшинной анестезии Золетилом-100 (100 мг/кг массы тела). Мозг разрезали по продольной щели больших полушарий, из каждой части извлекали гиппокамп и сразу же замораживали его на сухом льду. Правый гиппокамп использовали для ПЦР анализа, левый – для иммуноблоттинга. До анализа пробы хранили при –80 °C.

ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Для выделения суммарной РНК из гиппокампа 0.5 мг ткани гомогенизировали с 1 мл реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Гомогенаты центрифугировали при 4 °C и 12000 g в течение 10 мин, супернатант смешивали с хлороформом (0.2 мл на 1 мл раствора ExtractRNA), смесь инкубировали в течение 5–6 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 4 °C и 12000 g в течение 15 мин. К водной фазе, содержащей РНК, добавляли изопропанол (0.5 мл на 1 мл раствора ExtractRNA), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 4 °C и 12000 g в течение 10 мин. Осадок промывали 75%-ным этиловым спиртом, перерастворяли в dH₂O и хранили при –80 °C. Общее содержание РНК в пробах (260 нм) и чистоту (260/280 нм) оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer–N50 (IMPLEN, Германия). Коэффициент поглощения при 260/280 нм превышал 1.8 во всех образцах, что указывало на их высокую чистоту.

Для синтеза кДНК путем обратной транскрипции 1 мкг РНК смешивали с 1 мкл смеси случайных декануклеотидных праймеров (Random(dN)10-primer), инкубировали 2 мин при 75 °C и останавливали реакцию на льду. К смеси добавляли 4 мкл Storage Buffer 5x (Евроген, Россия), 2 мкл смеси дезоксинуклеотидов (dNTP), 2 мкл дитиотрита (DTT), 2 мкл деионизированной воды (dH₂O) и 1 мкл MMLV ревертазы из набора MMLV RT (Евроген, Россия). Смесь инкубировали в течение 5 мин при 25 °C, 60 мин при 42 °C и 5 мин при 70 °C. Полученную кДНК разбавляли в 10 раз dH₂O и хранили при –20 °C.

Реакции ПЦР проводили на термоциклере C1000 Touch с блоком обнаружения CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, США). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 17 мкл dH₂O, 5 мкл qPCRmix-HS SYBR Master Mix (Евроген, Россия), по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 нМ) и 1 мкл раствора исследуемого образца кДНК. Программа амплификации состояла из начальной денатурации при 95 °C (5 мин) и 45 циклов амплификации, каждый из которых включал этап денатурации при 95 °C (5 с), этап отжига при 57–63 °C (10–50 с) и этап элонгации при 72 °C (30 с).

Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения CFX Manager. Специфичность амплификации определяли по количеству пиков кривых плавления. Для этого ампликоны подвергали термической денатурации, включающей инкубацию при 65 °C (5 с) и медленное нагревание до 95 °C, после чего измеряли флуоресценцию. Все реакции проводили в трех повторах. Все гены также анализировали без ДНК-матрицы.

Последовательности использованных праймеров (синтезированных компаниями «Евроген», Россия) представлены в табл. 1. Для анализа были отобраны пары праймеров, имеющие эффективность амплификации, близкую к идеальному значению 2, и коэффициент корреляции 0.98 или выше. Температура плавления была оптимизи-

рована с помощью программы Primer Blast tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Содержание GC составляло 40–60%, размер продукта был ограничен 70–250 парами оснований. Эффективность амплификации рассчитывали по формуле $E = 10^{(1/\alpha)}$, где α – угол наклона стандартной кривой.

Относительную экспрессию целевых генов оценивали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$. В качестве референсных генов были выбраны *Ppia* и *Eef1a1*, для валидации использовали программу RefFinder, как описано ранее [20].

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для ПЦР в реальном времени

Ген	Номер NCBI	Последовательность праймеров
<i>Bcl2</i>	NM_016993.2	Прямой: GGTGAACTGGGGGAGGATTG Обратный: GCATGCTGGGGCCATATAGT
<i>Bax</i>	NM_017059.2	Прямой: TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG Обратный: GTCCAGCCCATGATGGTTCT
<i>Casp3</i>	NM_012922.2	Прямой: AACGGACCTGTGGACCTGAA Обратный: TCAATACCGCAGTCCAGCTCT
<i>Becn1</i>	NM_001034117.1	Прямой: AGCACGCCATGTATAGCAAAGA Обратный: GGAAGAGGGAAAGGACAGCAT
<i>Prkaa1</i>	NM_019142.2	Прямой: AAACCCACAGAAATCCAAACAC Обратный: CCTTCCATTATAGTCCAACCTG
<i>Akt1</i>	NM_033230.3	Прямой: CTCATTCCAGACCCACGAC Обратный: ACAGCCCGAAGTCCGTTA
<i>Mtor</i>	NM_019906.2	Прямой: AGAACCTGGCTCAAGTACGC Обратный: AGGATGGTCAAGTTGCCGAG
<i>Eef1a1</i>	NM_175838.1	Прямой: CTCCACTTGGTCGTTTTGCTG Обратный: GCAGACTTGGTGACTTTGCC
<i>Ppia</i>	NM_017101.1	Прямой: AGGATTTCATGTGCCAGGGTG Обратный: CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA

Иммуноблоттинг

Гиппокампы гомогенизировали в буфере, содержащем 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7.6), Triton X-100 (0.1%), ингибиторы протеаз (P8340, Sigma-Aldrich, США) и фосфатаз (1 mM Na_3VO_4 , 2 H_2O и 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$). Гомогенаты центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин для удаления неразрушенных клеток, аликвоты супернатантов отбирали для дальнейшей работы, а оставшуюся часть центрифугировали при 11000 g в течение 15 мин. Полученные супернатанты замораживали при -80°C до анализа. Общее содержание белка в пробах оценивали методом Лоури.

Полученные пробы гомогенатов гиппокампа смешивали с буфером Лэммли и нагревали при 90°C в течение 10 мин для денатурации белков. Методом SDS-PAGE электрофореза белки в пробах разделяли по молекулярной массе, используя гели с 7.5, 10%

или 12% акриламида. После разделения белки переносили из гелей на нитроцеллюлозные мембраны (GE Health Care/Life Sciences, Великобритания), неспецифическое связывание которых в течение часа блокировали 5%-ным раствором обезжиренного молока в буфере TTBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1 % Tween-20). Затем мембраны инкубировали в течение ночи с первичными антителами к тестируемым белкам. В работе использовали кроличьи антитела производства Cell Signaling (США) – Bcl-2 (D17C4) (1: 500, #3498), Bax (1: 500, #2772), Cleaved Caspase-9 (Asp353) (1: 200, #9507), Caspase-3 (D3R6Y) (1: 500, #14220), Cleaved caspase-3 (Asp175) (5A1E) (1: 200, #9664), Caspase-8 (D3SG2) (1: 500, #4790), Ulk-1 (D8H5) (1: 500, #8054), Beclin-1 (D40C5) (1: 500, #3495), Phospho-Beclin-1 (Ser30) (E1C4X) (1: 200, #35955), AMPK α (D5A2) (1: 500, #5831), Akt (pan) (C67E7) (1: 500, #4691), RIP (D94C12) (1: 750, #3493), MLKL (D2I6N) (1: 750, #14993); BioVision (США) – Fas (1: 1000, #3070R) и Sigma-Aldrich (США) – mTOR (1: 500, # SAB4501038), а также мышинные антитела Cell Signaling к Caspase-9 (C9) (1: 1000, #9508) и Cleaved Caspase-8 (Asp384) (11G10) (1: 200, #9748). В качестве вторичных использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1: 1000, GE Health Care/Life Sciences, Великобритания). Иммунопозитивный сигнал визуализировали с помощью набора хемилюминесцентных растворов ECL (GE Health Care/Life Sciences, Великобритания), используя рентгеновскую пленку и проявочные растворы фирмы СЕА (Швеция). Для нормализации экспрессии изучаемых белков мембраны инкубировали с первичными антителами мыши или кролика к GAPDH (1: 1000, sc-32233, sc-166545, sc-25778) производства Santa Cruz Biotechnology (США). Денситометрический анализ экспрессии белков проводили с помощью программы ImageJ program (NIH, США).

Результаты экспериментов анализировали в программе GraphPad Prism 8.1 (San Diego, CA, США), нормальность распределения оценивали с помощью критерия Shapiro-Wilk, для проверки выборок на выбросы использовали критерий ROUT ($\alpha = 0.05$). Статистически значимые различия определяли с помощью алгоритмов ANOVA и апостериорного теста Dunnett's. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия посредников митохондриального и рецепторного путей апоптоза в клетках гиппокампа крыс

Для анализа влияния избыточного потребления F⁻ на экспрессию посредников митохондриального каскада апоптоза были выбраны белки семейства Bcl-2 (Bcl-2 и Bax), инициаторная каспаза-9 и эффекторная каспаза-3.

Уровень мРНК гена *Bcl2*, кодирующего антиапоптотический белок Bcl-2, в клетках гиппокампа крыс, получавших F⁻, не изменялся по сравнению с таковым у животных, получавших воду с нормальным содержанием F⁻. Экспрессия гена *Bax*, кодирующего проапоптотический белок Bax, напротив, статистически значимо увеличивалась в гиппокампе животных из всех групп, подверженных действию F⁻ (рис. 1a). Содержание белка Bcl-2 снижалось по сравнению с контролем в клетках гиппокампа животных, потреблявших 20 и 50 мг/л F⁻. Наоборот, уровень экспрессии белка Bax увеличивался в гиппокампе крыс, получавших все три дозы F⁻ (рис. 1b, c). Такие изменения привели к снижению соотношения между экспрессией антиапоптотического и проапоптотического маркеров этого семейства как на уровне транскрипции (рис. 1d), так и на уровне трансляции (рис. 1e).

Средний уровень нативной формы каспазы-9 с молекулярной массой 51 kDa был низким в цитоплазме клеток гиппокампа контрольных животных, однако он повышался в гиппокампе крыс из всех групп, получавших избыток фтора (рис. 2a, b). Кроме того, в гиппокампе животных, получавших 20 и 50 мг/л F⁻, наблюдалось увеличение

содержания зрелой формы каспазы-9 с молекулярной массой 38 kDa (рис. 2а, б). Такие процессы приводят к изменению соотношения уровней экспрессии прокаспазы-9, не обладающей протеолитической активностью, и активной каспазы-9, принимающей участие в реализации программы апоптоза.

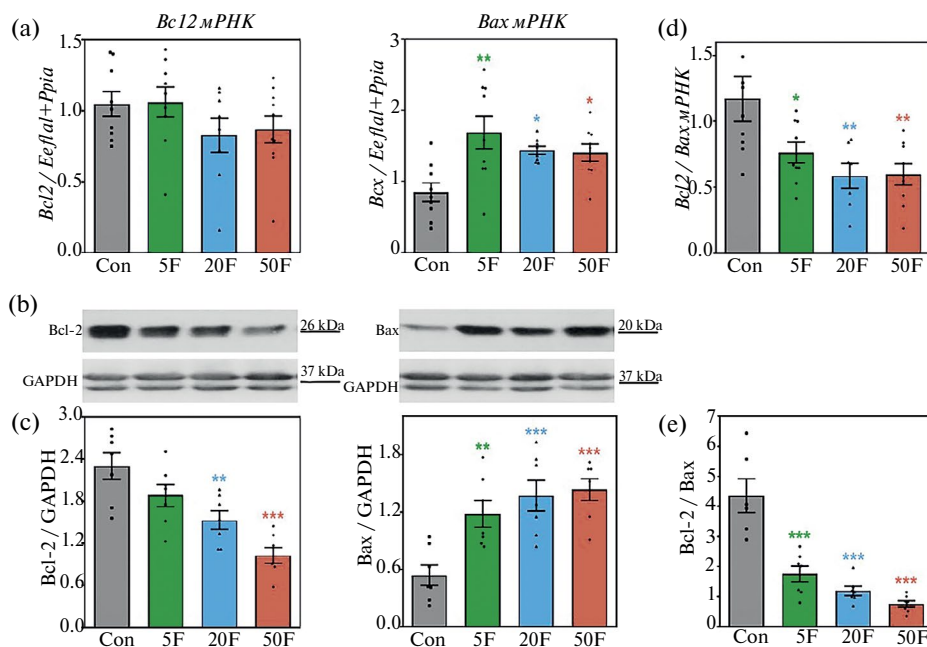


Рис. 1. Изменения экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Bax в гиппокампе крыс после воздействия F⁻ на уровне транскрипции и трансляции. (а) – Уровни экспрессии генов *Bcl2* и *Bax* в клетках гиппокампа, нормализованные по отношению к экспрессии пары референсных генов *Eef1a1+Ppia* (средние значения $\pm$ SE, $n = 7-9$). (б) – Репрезентативные иммуноблоты для одной крысы из каждой группы. (с) – Среднее содержание белков Bcl-2 и Bax $\pm$ SE в клетках гиппокампа, рассчитанное по отношению к оптической плотности референсного белка GAPDH ($n = 7$). (д) – Отношение экспрессии генов *Bcl-2* и *Bax*. (е) – Соотношение уровней белка Bcl-2 и Bax. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контрольной группой (Con).

Экспрессия гена *Casp-3*, кодирующего один из ключевых посредников апоптоза – каспазу-3, была сравнима в клетках гиппокампа крыс из всех экспериментальных групп (рис. 3а). Однако содержание этой эффекторной молекулы изменялось на уровне белка. В гиппокампе контрольных животных практически весь клеточный пул каспазы-3 был представлен ее протеолитически неактивной проформой с молекулярной массой 32 kDa, однако у крыс, получавших 20 и 50 мг/л F⁻, уровень этой нативной формы достоверно снижался (рис. 3б, с). В противоположность этому в клетках гиппокампа крыс из контрольной группы определялись лишь небольшие количества активной каспазы-3 с молекулярной массой 17 kDa, но воздействие 5, 20 и 50 мг/л F⁻ привело к значительному увеличению ее содержания. Такие изменения уровней экспрессии прокаспазы-3 и активной каспазы В привели к смещению соотношения в сторону последней (рис. 3д) и подтверждают стимуляцию процессов апоптоза.

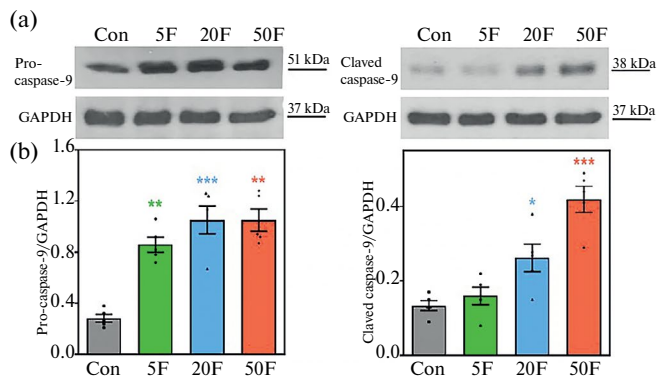


Рис. 2. Уровень каспазы-9 в гиппокампе крыс, потреблявших избыток F⁻. (a) – Типичные примеры иммуноблотов нативной формы каспазы-9 и активной каспазы-9 для одной крысы из каждой экспериментальной группы. (b) – Среднее содержание $\pm SE$ двух форм каспазы-9, нормализованное по GAPDH ($n = 5$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

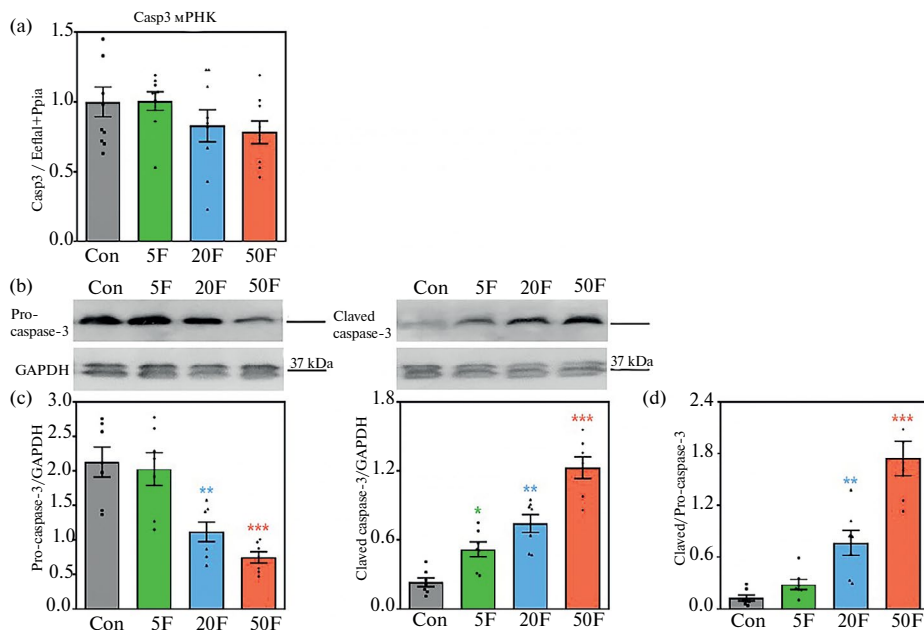


Рис. 3. Стимуляция каспазы-3 в гиппокампе крыс, потреблявших избыток F⁻. (a) – Уровни *Casp3* мРНК в клетках гиппокампа крыс всех экспериментальных групп (средние значения $\pm SE$, $n = 8-10$). (b) – Типичные примеры иммуноблотов нативной формы каспазы-3 и активной каспазы-3 для одной крысы из каждой экспериментальной группы. (c) – Среднее содержание $\pm SE$ двух форм каспазы-3, нормализованное по GAPDH. (d) – Изменения соотношения уровней прокаспазы-3 и активной каспазы-3 ($n = 6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Однако длительное воздействие избыточных доз F^- на организм крыс не оказало влияния на уровень белка одного из ключевых компонентов рецепторного пути апоптоза – каспазы-8 в клетках гиппокампа (рис. 4а, б). Содержание мембранного рецептора Fas в гиппокампе крыс, получавших избыточные дозы F^- , было сравнимо с таковым у контрольных животных (рис. 4а, б).

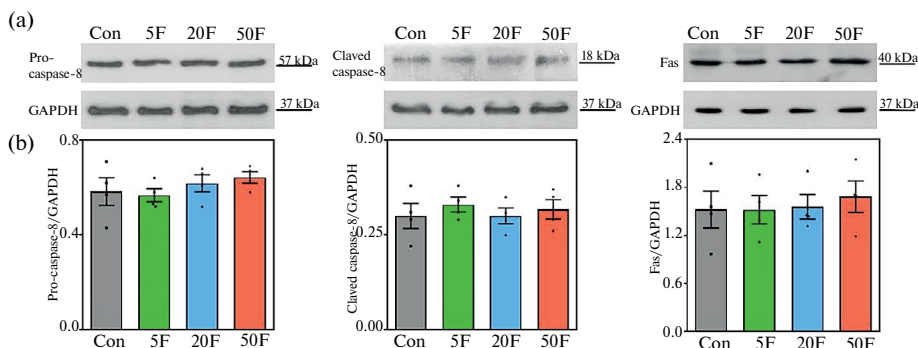


Рис. 4. Экспрессия на уровне белка двух форм каспазы-8 и рецепторов Fas в клетках гиппокампа крыс после длительного воздействия F^- . (а) – Пример иммуноблотов для одного животного из каждой группы. (б) – Среднее содержание белков каспазы-8 и Fas $\pm SE$ в клетках, рассчитанное по отношению к содержанию референсного белка GAPDH ($n = 4$).

Таким образом, длительное потребление крысами избыточных доз F^- сопровождается активацией эффекторов митохондриального, но не рецепторного пути апоптоза.

Экспрессия посредников аутофагии в клетках гиппокампа крыс, получавших избыточные дозы F^-

В клетках гиппокампа крыс, получавших избыток F^- , содержание белка Ulk-1, который принимает сигналы от разнообразных внутриклеточных протеинкиназ, регулирующих процессы клеточного метаболизма, и таким образом функционирует как инициатор аутофагии, не изменялось по сравнению с таковым у контрольных крыс (рис. 5а). Однако длительное воздействие всех экспериментальных доз F^- привело к изменению экспрессии гена *Beclin1*, кодирующего белок Beclin-1, который играет важнейшую роль в процессе формирования и созревания фагофора (рис. 5б). В гиппокампе крыс, потреблявших 20 и 50 мг/л F^- , также снижались уровни нативной и фосфорилированной форм этого ключевого посредника аутофагии (рис. 5с).

Длительное потребление крысами избыточных доз F^- также не оказало влияния на уровни мРНК и белка некоторых внутриклеточных модуляторов аутофагии – киназы AMPK, функционирующей как энергетический сенсор клеток и напрямую фосфорилирующей белок Ulk-1, киназы Akt – посредника сигнального пути PI3K/Akt, регулирующего рост и выживание клеток, и киназы mTOR, предотвращающей взаимодействие Ulk1 и AMPK (рис. 6).

Влияние избыточного потребления F^- крысами на экспрессию посредников некроптоза в гиппокампе крыс

Экспрессия исследуемых посредников некроптоза – белков RIP и MLKL также не изменялась в клетках гиппокампа крыс, получавших избыток фтора (рис. 7).

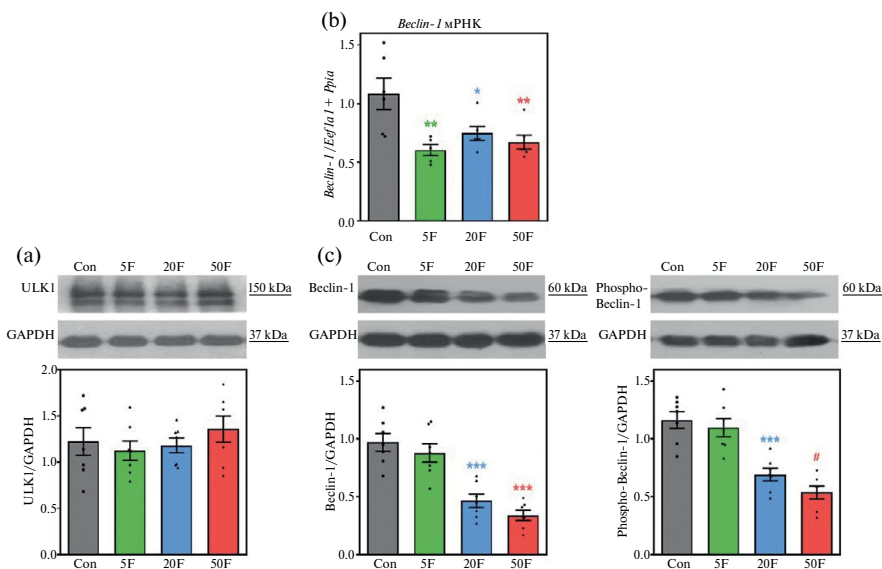


Рис. 5. Экспрессия посредников аутофагии в гиппокампе крыс, подверженных воздействию F⁻. (а) – Типичные иммуноблоты и средние уровни $\pm$ SE белка ULK-1 в клетках гиппокампа крыс, получавших разные дозы F⁻ ($n = 7$). (б) – Изменения экспрессии гена *Beclin1* в гиппокампе животных, получавших избыток F⁻, на уровне транскрипции ($n = 6$). (с) – Изменения содержания белка Beclin-1 в гиппокампе животных после длительного потребления F⁻ ($n = 6$). Показаны типичные иммуноблоты для одного животного из каждой группы и средние значения $\pm$ SE нативной и фосфорилированной форм (Ser30) Beclin-1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.0001$ по сравнению с контролем.

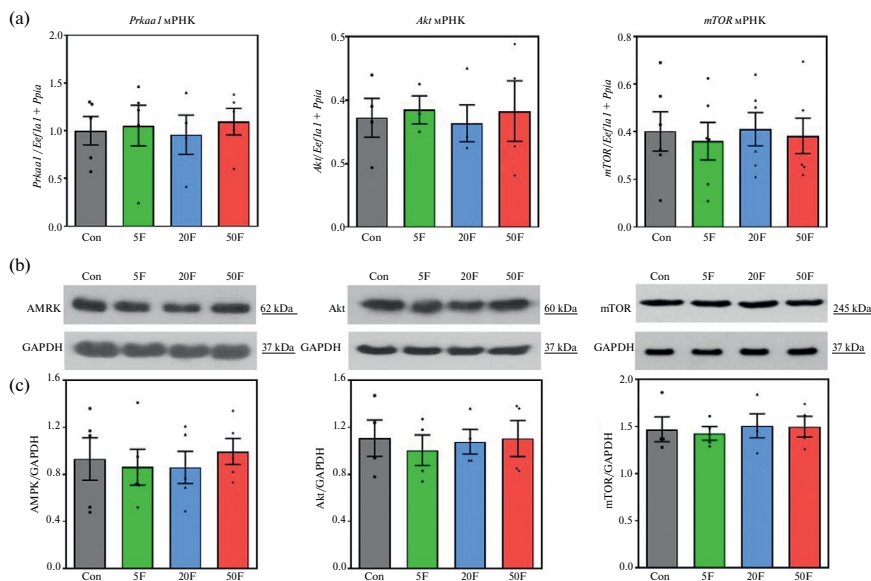


Рис. 6. Экспрессия модуляторов аутофагии AMPK, Akt и mTOR в гиппокампе крыс, получавших избыток F⁻, на уровне транскрипции и трансляции. (а) – Уровни экспрессии генов *Prkaa1*, *Akt* и *mTOR* в клетках гиппокампа крыс. (б) – Репрезентативные иммуноблоты для одного животного из каждой группы. (с) – Средние значения $\pm$ SE содержания AMPK, Akt и mTOR на уровне белка ($n = 5$).

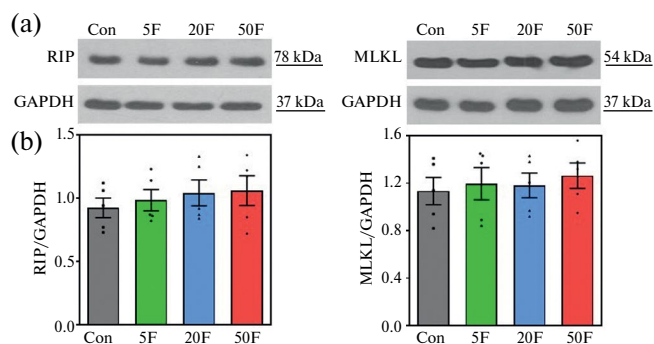


Рис. 7. Уровни белков RIP и MLKL в гиппокампе крыс, получавших разные дозы F⁻. (a) – Показательные иммуноблоты для одного животного из каждой группы. (b) – Средние значения содержания $\pm$ SE белков RIP и MLKL в клетках гиппокампа ($n = 5$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного исследования показали, что длительное потребление крысами избыточных количеств F⁻ привело к изменениям экспрессии маркеров гибели клеток, функционирующих как регуляторы митохондриального пути апоптоза, в частности, к снижению уровня антиапоптотического белка Bcl-2, но активации проапоптотического белка Вах, инициаторной каспазы-9 и эффекторной каспазы-3 (рис. 1–3). Однако воздействие F⁻ не оказало влияния на экспрессию каспазы-8 и мембранных рецепторов Fas – важнейших эффекторов рецепторного пути апоптоза (рис. 4).

Апоптоз представляет собой многоступенчатый и хорошо контролируемый тип клеточной гибели, играющий ключевую роль в процессах разрушения и утилизации поврежденных или лишних клеток как в ходе нормального физиологического развития и роста организма, так и при патологических состояниях [13–15]. Семейство Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) включает в себя несколько белков, функционирующих как активаторы каспаз [21, 22]. Располагаясь на внешней мембране митохондрий, Bcl-2 связывает проапоптотические белки (в том числе Вах), таким образом подавляя их активность и обеспечивая целостность мембраны. Если уровень Bcl-2 снижается, Вах олигомеризуется и образует поры на внешней мембране митохондрий, что увеличивает ее проницаемость и приводит к выходу нескольких белков, включая цитохром С, из межмембранного пространства в цитоплазму клеток. Эти и множество других летальных стимулов, формирующихся внутри клеток или на их мембранах, последовательно стимулируют инициаторные (каспазы-2, -8, -9, -10, -12) и эффекторные (каспазы-3, -6 и -7) каспазы – цистеиновые протеазы, участвующие в протеолитическом расщеплении клеточных субстратов и разрушении клеточных компонентов [23, 24]. Таким образом, белки Bcl-2 и каспазы являются ключевыми игроками сигнальных каскадов митохондриального каскада апоптоза.

Апоптотическая трансформация клеток мозга экспериментальных животных, подверженных действию F⁻, и клеток нейрональных линий, культивируемых в присутствии высоких концентраций F⁻, была описана в нескольких работах ранее [25, 26]. Например, число апоптотических клеток увеличивалось в поле гиппокампа CA3 18-дневных эмбрионов и крысят первых 28 дней жизни, чьи матери потребляли 45–50 мг/л F⁻ в период гестации и лактации [27, 28]. Повышенный уровень апоптоза также наблюдался

в гиппокампе или целом мозге взрослых крыс, подвергавшихся воздействию 50–100 мг/л NaF в течение 6 месяцев [28–31]. Гибель клеток микроглии была описана у крыс, потреблявших 60–120 мг/л F⁻ в течение 10 недель [32]. Развитие апоптоза сопровождалось ингибированием активности белка Bcl-2, но увеличением экспрессии белка Вах, каспазы-12, каспазы-9, каспазы-3, высвобождением PARP и цитохрома С как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции [27, 31, 32]. Снижение экспрессии Bcl-2, но стимуляция Вах и каспазы-3 были выявлены и в клетках нейробластомы линий PC12 и SH-SY5Y, культивируемых с NaF [33, 34].

Одновременно со стимуляцией эффекторов апоптоза в клетках гиппокампа крыс, потреблявших избыток F⁻ в течение года, наблюдалось ингибирование ключевого посредника аутофагии Beclin-1 (рис. 5), хотя экспрессия инициаторного белка аутофагии Ulk-1 (рис. 5) и его модуляторов AMPK, Akt и mTOR (рис. 6) не изменялась. Аутофагия представляет собой сложный катаболический процесс, характеризующийся формированием аутофагосом, доставляющих поврежденные белки и органеллы к лизосомам, что приводит к образованию аутолизосом с последующей деградацией и утилизацией содержимого [14, 15]. Аутофагия обычно активируется в ответ на недостаток питательных веществ, а нарушение ее процессов в клетках мозга часто наблюдается при различных нейродегенеративных заболеваниях [16, 17]. Каскад киназ PI3K/Akt/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/Akt kinase/mammalian target of rapamycin) является одним из важнейших сигнальных путей, контролирующих такие клеточные функции, как пролиферация, рост, метаболизм и выживание [35]. Белок Ulk-1 критически необходим для ранних этапов биогенеза аутофагосом и играет центральную роль в индукции аутофагии, запуская каскад фосфорилирования нижестоящих эффекторов в составе белковых комплексов. Протеинкиназа AMPK фосфорилирует Ulk-1 по нескольким аминокислотным остаткам, включая Ser317, Ser555 и Ser777, в то время как mTOR фосфорилирует Ulk-1 по Ser757 и нарушает взаимодействие между Ulk-1 и AMPK. В свою очередь, Ulk-1 фосфорилирует ключевой посредник аутофагии – Beclin-1, который локализуется около митохондрий и в нормальных клетках ингибирует этот тип клеточной гибели, образуя комплексы с антиапоптотическими белками Bcl-2 и Bcl-xL [36–38]. Однако стрессовые стимулы приводят к диссоциации Beclin-1 от Bcl-2 вследствие конкурентного взаимодействия Bcl-2 и Вах. Активный свободный Beclin-1 вместе с киназой PI3K запускает формирование и созревание фагофора. Если же уровень Bcl-2 в клетках снижается, Beclin-1 деактивируется и начинается процесс апоптоза. Таким образом, кинетика взаимодействия Beclin-1 и Bcl-2 является одним из основных факторов выбора клеток между аутофагией и апоптозом.

В нашем исследовании длительное отравление крыс F⁻ привело к подавлению важнейшего посредника аутофагии и смещению механизмов гибели клеток гиппокампа в сторону апоптоза, вероятнее всего, через нарушение взаимодействия Beclin-1 и Bcl-2 или истощение клеточного пула этих молекул. Однако в нескольких предыдущих исследованиях, наоборот, была описана активация ключевых маркеров аутофагии в мозге лабораторных животных. Так, в гиппокампе крыс, получавших 25–100 мг/л F⁻ в течение 6 месяцев, было выявлено значимое повышение уровней Beclin-1, LC3-II и p62 [39, 40]. Мы полагаем, что такое расхождение может быть связано с разной длительностью воздействия F⁻. Аутофагия часто используется клетками как альтернативный источник энергии, поэтому ее активация после короткого действия стрессовых стимулов может быть адаптивным компенсаторным ответом, чтобы избежать гибели. В случае продолжительного влияния неблагоприятных факторов на клетки уровней или активности эффекторов аутофагии может быть недостаточно, поэтому активируются процессы апоптоза.

Экспрессия посредников некроптоза RIP и MLKL также оставалась стабильной в клетках гиппокампа крыс, получавших избыток F⁻ (рис. 7). Некроптоз, один из путей некротического типа гибели, запускается разнообразными воспалительными сигнала-

ми и негативно регулируется каспазами. Этот механизм инициируется через комплексы, называемые некросомами и состоящие из киназ RIP (receptor-interacting protein) и их мишеней MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein) [14, 41]. Возможное участие некроптоза в реализации патологических процессов в мозге лабораторных животных под действием F⁻ не было исследовано ранее, однако наша работа показала, что токсические эффекты F⁻ на клетки гиппокампа крыс даже после продолжительного воздействия не связаны с активацией этого типа гибели.

Таким образом, морфологические изменения и гибель клеток гиппокампа, включая нейроны, описанные в нашем предыдущем исследовании, осуществляются преимущественно по митохондриальному пути апоптоза на фоне ингибирования аутофагии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (Н. И. А.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (Н. И. А., О. В. Н.), обработка результатов (Н. И. А., О. В. Н.), написание и редактирование текста (Н. И. А., О. В. Н.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания № 075–00264–24–00 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Исследование проведено с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 9/2020 от 24.09.2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnston NR, Strobel SA (2020) Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. Arch Toxicol 94(4): 1051–1069. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02687-5>
2. Shaji E, Sarath KV, Santosh M, Krishnaprasad PK, Arya BK, Manisha S Babu (2024) Fluoride contamination in groundwater: a global review of the status, processes, challenges, and remedial measures. Geosci Front 15: 101734. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2023.101734>
3. Макеева ИМ, Волков АГ, Мусиев АА (2017) Эндемический флюороз зубов – причины, профилактика и лечение. Росс стоматол журн 21(6): 340–344. [Makeeva IM, Volkov AG, Musiev AA (2017) Endemic fluorosis of teeth – causes, prevention and treatment. Russ Stomatol J 21(6): 340–344. (In Russ)].
4. Lubojanski A, Piesiak-Panczynszyn D, Zakrzewski W, Dobrzynski W, Szymonowicz M, Rybak Z, Mielan B, Wiglusz RJ, Watras A, Dobrzynski M (2023) The safety of fluoride compounds and their effect on the human body-a narrative review. Materials (Basel) 16(3): 1242. <https://doi.org/10.3390/ma16031242>

5. *Taher MK, Momoli F, Go J, Hagiwara S, Ramoju S, Hu X, Jensen N, Terrell R, Hemmerich A, Krewski D* (2024) Systematic review of epidemiological and toxicological evidence on health effects of fluoride in drinking water. *Crit Rev Toxicol* 6: 1–33.
<https://doi.org/10.1080/10408444.2023.2295338>
6. *Petrović B, Kojić S, Milić L, Luzio A, Perić T, Marković E, Stojanović GM* (2023) Toothpaste ingestion-evaluating the problem and ensuring safety: systematic review and meta-analysis. *Front Public Health* 11: 1279915.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1279915>
7. *Veneri F, Iamandii I, Vinceti M, Birnbaum LS, Generali L, Consolo U, Filippini T* (2023) Fluoride exposure and skeletal fluorosis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Curr Environ Health Rep* 10(4): 417–441.
<https://doi.org/10.1007/s40572-023-00412-9>
8. *Agalakova NI, Nadei OV* (2020) Inorganic fluoride and functions of brain. *Crit Rev Toxicol* 50(1): 28–46.
<https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1722061>
9. *Ottappilakkil H, Babu S, Balasubramanian S, Manoharan S, Perumal E* (2023) Fluoride induced neurobehavioral impairments in experimental animals: a brief review. *Biol Trace Elem Res* 201(3): 1214–1236.
<https://doi.org/10.1007/s12011-022-03242-2>
10. *Veneri F, Vinceti M, Generali L, Giannone ME, Mazzoleni E, Birnbaum LS, Consolo U, Filippini T* (2023) Fluoride exposure and cognitive neurodevelopment: systematic review and dose-response meta-analysis. *Environ Res* 221: 115239.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115239>
11. *Nadei OV, Khvorova IA, Agalakova NI* (2020) Cognitive decline of rats with chronic fluorosis is associated with alterations in hippocampal calpain signaling. *Biol Trace Elem Res* 197(2): 495–506.
<https://doi.org/10.1007/s12011-019-01993-z>
12. *Надей ОВ, Иванова ТИ, Суфиева ДА, Агалакова НИ* (2020) Морфологические изменения нейронов гиппокампа крыс как результат избыточного потребления фтора. *Журн анат гистопатол* 9(2): 53–60. [*Nadei OV, Ivanova TI, Sufieva DA, Agalakova NI* (2020) Morphological Changes of the Rat Hippocampal Neurons Following Excessive Fluoride Consumption. *J Anat Histopathol* 9(2): 53–60. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2020-9-2-53-60>
13. *Newton K, Strasser A, Kayagaki N, Dixit VM* (2024) Cell death. *Cell* 187(2): 235–256.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.044>
14. *Ai Y, Meng Y, Yan B, Zhou Q, Wang X* (2024) The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death. *Mol Cell* 84(1): 170–179.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.11.040>
15. *Gupta R, Ambasta RK, Pravir Kumar* (2021) Autophagy and apoptosis cascade: which is more prominent in neuronal death? *Cell Mol Life Sci* 78(24): 8001–8047.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-04004-4>
16. *Deng Z, Zhou X, Lu JH, Yue Z* (2021) Autophagy deficiency in neurodevelopmental disorders. *Cell Biosci* 11(1): 214.
<https://doi.org/10.1186/s13578-021-00726-x>
17. *Liénard C, Pintart A, Bomont P* (2024) Neuronal autophagy: regulations and implications in health and disease. *Cells* 13(1): 103.
<https://doi.org/10.3390/cells13010103>
18. *Agalakova NI, Gusev GP* (2013) Excessive fluoride consumption leads to accelerated death of erythrocytes and anemia in rats. *Biol Trace Elem Res* 153(1–3): 340–349.
<https://doi.org/10.1007/s12011-013-9691-y>
19. *Baselt RC* (2004) Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 7th ed. Biomedical Publications. Foster City, CA. 468–470.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.039271>
20. *Nadei OV, Agalakova NI* (2024) Optimal reference genes for RT-qPCR experiments in hippocampus and cortex of rats chronically exposed to excessive fluoride. *Biol Trace Elem Res* 202(1): 199–209.
<https://doi.org/10.1007/s12011-023-03646-8>
21. *King LE, Hohorst L, García-Sáez AJ* (2023) Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond. *J Cell Sci* 136(22): jcs260790.
<https://doi.org/10.1242/jcs.260790>
22. *Gong Q, Wang H, Zhou M, Zhou L, Wang R, Li Y* (2024) B-cell lymphoma-2 family proteins in the crosshairs: Small molecule inhibitors and activators for cancer therapy. *Med Res Rev* 44(2): 707–737.
<https://doi.org/10.1002/med.21999>

23. *Dixit VM* (2023) The road to death: caspases, cleavage, and pores. *Science Adv* 9(17): eadi2011. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi2011>
24. *Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, Murthy MK* (2023) Review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis. *Mol Neurobiol* 60(10): 5805–5837. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03433-5>
25. *Ribeiro DA, Cardoso CM, Yujra VQ, De Barros Viana M, Aguiar O Jr, Pisani LP, Oshima CT* (2017) Fluoride induces apoptosis in mammalian cells: in vitro and in vivo studies. *Anticancer Res* 37: 4767–4777. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11883>
26. *Angwa LM, Nyadanu SD, Kanyugo AM, Adampah T, Pereira G* (2023) Fluoride-induced apoptosis in non-skeletal tissues of experimental animals: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon* 9(8): e18646. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18646>
27. *Sun Y, Ke L, Zheng X, Li T, Ouyang W, Zhang Z* (2017) Effects of different levels of calcium intake on brain cell apoptosis in fluorosis rat offspring and its molecular mechanisms. *Biol Trace Elem Res* 176(2): 355–366. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0850-9>
28. *Wei N, Dong YT, Deng J, Wang Y, Qi XL, Yu WF, Xiao Y, Zhou JJ, Guan ZZ* (2018) Changed expressions of N-methyl-D-aspartate receptors in the brains of rats and primary neurons exposed to high level of fluoride. *J Trace Elem Med Biol* 45: 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.09.020>
29. *Liu YJ, Guan ZZ, Gao Q, Pei JJ* (2011) Increased level of apoptosis in rat brains and SH-SY5Y cells exposed to excessive fluoride—a mechanism connected with activating JNK phosphorylation. *Toxicol Lett* 204: 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.04.030>
30. *Wang C, Liang C, Ma J, Manthari RK, Niu R, Wang J, Wang J, Zhang J* (2018) Co-exposure to fluoride and sulfur dioxide on histological alteration and DNA damage in rat brain. *J Biochem Mol Toxicol* 32(2). <https://doi.org/10.1002/jbt.22023>
31. *Tang Y, Zhang J, Hu Z, Xu W, Xu P, Ma Y, Xing H, Niu Q* (2023) PRKAA1 induces aberrant mitophagy in a PINK1/Parkin-dependent manner, contributing to fluoride-induced developmental neurotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 255: 114772. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114772>
32. *Yan N, Liu Y, Liu S, Cao S, Wang F, Wang Z, Xi S* (2016) Fluoride-induced neuron apoptosis and expressions of inflammatory factors by activating microglia in rat brain. *Mol Neurobiol* 53: 4449–4460. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9380-2>
33. *Liao Q, Zhang R, Wang X, Nian W, Ke L, Ouyang W, Zhang Z* (2017) Effect of fluoride exposure on mRNA expression of cav1.2 and calcium signal pathway apoptosis regulators in PC12 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 54: 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.018>
34. *Tu W, Zhang Q, Liu Y, Han L, Wang Q, Chen P, Zhang S, Wang A, Zhou X* (2018) Fluoride induces apoptosis via inhibiting SIRT1 activity to activate mitochondrial p53 pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 347: 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.030>
35. *Chen J, Rodriguez AS, Morales MA, Fang X* (2023) Autophagy modulation and its implications on glioblastoma treatment. *Curr Issues Mol Biol* 45(11): 8687–8703. <https://doi.org/10.3390/cimb45110546>
36. *Menon MB, Dhamija S* (2018) Beclin 1 Phosphorylation – at the center of autophagy regulation. *Front Cell Dev Biol* 6: 137. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00137>
37. *Rong Z, Zheng K, Chen J, Jin X* (2022) Function and regulation of ULK1: From physiology to pathology. *Gene* 840: 146772. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146772>
38. *Prerna K, Dubey VK* (2022) Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: new understanding. *Int J Biol Macromol* 204: 258–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.005>
39. *Niu Q, Chen J, Xia T, Li P, Zhou G, Xu C, Zhao Q, Dong L, Zhang S, Wang A* (2018) Excessive ER stress and the resulting autophagic flux dysfunction contribute to fluoride-induced neurotoxicity. *Environ Pollut* 233: 889–899. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.015>

40. Han X, Tang Y, Zhang Y, Zhang J, Hu Z, Xu W, Xu S, Niu Q (2022) Impaired V-ATPase leads to increased lysosomal pH, results in disrupted lysosomal degradation and autophagic flux blockage, contributes to fluoride-induced developmental neurotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 236: 113500. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113500>
41. Zhang L, Hu Z, Li Z, Lin Y (2024) Crosstalk among mitophagy, pyroptosis, ferroptosis, and necroptosis in central nervous system injuries. *Neural Regen Res* 19(8): 1660–1670. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.389361>

Expression of Apoptosis, Autophagy and Necroptosis Effectors in Cells of Rat Hippocampus after Excessive F⁻ Consumption

O. V. Nadei^a, and N. I. Agalakova^{a, *}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
Saint-Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: nagalak@mail.ru*

The work examined the expression of apoptosis, autophagy and necroptosis markers in hippocampal cells of rats after long-term consumption of excessive F⁻ doses at the transcriptional and translational levels. Male Wistar rats were divided into 4 groups receiving 0.4 (control), 5, 20 and 50 mg/l F⁻ (as NaF) for 12 months. The changes in contents of effectors of mitochondrial (Bcl-2, Bax, Caspase-9, Caspase-3) and receptor (Caspase-8, Fas) pathways of apoptosis, mediators (Ulk-1, Beclin-1) and modulators (AMPK, Ark, mTOR) of autophagy, as well as that of necroptosis (RIP and MLKL) were assessed by immunoblotting, the gene expression (*Bcl2*, *Bax*, *Casp3*, *Ulk1*, *Beclin1*, *Prkaa1*, *Akt*, and *mTor*) – by real-time PCR. In the hippocampus of F⁻ – exposed animals, the expression ratio of *Bcl2/Bax* genes and Bcl-2/Bax proteins decreased, caspase-9 and caspase-3 were activated, but the level of caspase-8 and membrane Fas receptor remained stable. Long-term F⁻ consumption had no effect on the content of autophagy initiator Ulk-1 and protein kinases AMPK, Akt and mTOR, but resulted in inhibition of key autophagy mediator Beclin-1. The expression level of necroptosis RIP and MLKL effectors in the hippocampal cells of rats received excessive F⁻ did not change as well. Thus, long-term F⁻ exposure was accompanied by activation of apoptosis, mainly through the mitochondrial pathway, at the background of autophagy suppression.

Key words: rat, hippocampus, fluoride ions, apoptosis, autophagy, necroptosis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭКСПРЕССИЯ ПАРВАЛЬБУМИНА, ОСТЕОПОНТИНА И ГЛИПИКАНА 4
В НЕЙРОНАХ ОТДАЛЕННОГО ОТ ЭПИЦЕНТРА ТРАВМАТИЧЕСКОГО
ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЯСНИЧНОГО ОТДЕЛА СПИННОГО МОЗГА**

© 2024 г. О. Н. Тутова¹, И. М. Кабдеш^{1,*}, Я. О. Мухамедшина^{1,2}, Ю. А. Челышев^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

*E-mail: ikabdeshe@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2024 г.

После доработки 13.08.2024 г.

Принята к публикации 14.08.2024 г.

Травма спинного мозга (ТСМ) проявляется патологическими изменениями в областях, значительно отдаленных от области первичного повреждения. Для поиска потенциальных терапевтических мишеней с целью восстановления двигательной функции особенно актуально выявить причины и механизмы этих сдвигов в поясничном отделе спинного мозга при повреждении в проксимальных его отделах. На модели дозированной контузионной ТСМ крысы на уровне сегмента Th8 изучена экспрессия Са-связывающего белка парвальбумина (PARV), остеопонтина (OPN) и глипикана 4 (GPC4) в нейронах пластинок VII, VIII и IX в пределах сегментов L3–4 на 7-е и 60-е сутки эксперимента. В пластинках VII и IX в острую и хроническую фазу ТСМ показано уменьшение количества PARV⁺ нейронов, что может указывать на снижение связывания кальция в нейронах передних рогов на уровне сегментов L3–4. Снижение экспрессии PARV в этих нейронах указывает на повышение риска их уязвимости и нарушения двигательной функции. Впервые изучен характер экспрессии OPN в нейронах поясничного отдела, отдаленного от эпицентра травматического повреждения. Во всех изученных пластинках в передних рогах серого вещества нами не отмечены сдвиги в количестве OPN⁺ нейронов как в острой, так и в хронической фазе ТСМ. В пластинке IX поясничного отдела выявлено увеличение количества GPC4⁺ нейронов в остром посттравматическом периоде, что можно рассматривать в ключе позитивной приспособительной реакции нейронов в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе спинного мозга. Оценка этой реакции как позитивной основана на данных о связывании заякоренного на поверхности нейрона GPC4 с различными молекулами, обладающими нейротекторной активностью и стимулирующими нейрорегенерацию.

Ключевые слова: травма спинного мозга, отдаленное повреждение, парвальбумин, остеопонтин, глипикан

DOI: 10.31857/S0869813924090073, **EDN:** AJVIPE

ВВЕДЕНИЕ

Травма ЦНС запускает каскад молекулярных и клеточных событий в эпицентре повреждения. При этом патологические сдвиги выявлены в отдаленных отделах головного и спинного мозга [1–4]. Причины и механизмы этих сдвигов остаются неясными.

Становится все более очевидным, что при травме спинного мозга (ТСМ) в стратегии восстановления функции важно учитывать патологические сдвиги не только в области травматического повреждения, но и в отдаленном от эпицентра отделе. При ТСМ в шейном или грудном отделе, помимо эпицентра повреждения, особый интерес для выяснения механизмов пластичности и нейрорегенерации представляет недооцененный поясничный отдел, содержащий нейронные сети, критически важные для поддержания и восстановления двигательной функции. В хроническую фазу ТСМ в поясничном отделе происходит реорганизация нейронных сетей и приспособление их к функционированию в новых условиях [5–8].

После ТСМ в грудном отделе в поясничном отделе отмечены признаки усиления пластичности, связанные с появлением чувствительности нейронов к низким уровням нейротрансмиттеров, повышенным синаптогенезом и ремоделированием синапсов [9–11]. Все это предполагает возможность реактивации локальных нейронных сетей и улучшения двигательной функции [12]. Для понимания механизмов патологических изменений в отдаленном от эпицентра травмы поясничном отделе и оценки перспектив восстановления функции важно выявить сдвиги в экспрессии функционально значимых молекул в острой и хронической фазе ТСМ. Из достаточно большого списка подобных молекул для данного исследования мы наметили парвальбумин (PARV), остеопонтин (OPN) и глипикан 4 (GPC4).

Са-связывающие белки регулируют гомеостаз кальция в нейронах. Из них наиболее изучены кальбиндин D28K, кальретинин и PARV, принадлежащие к семейству с белковым доменом EF-hand. В спинном мозге тормозные PARV+ интернейроны способны быстро увеличивать частоту спайков [13–17]. Интерес к этим нейронам обусловлен критической важностью процесса торможения для восстановления двигательной функции при ТСМ [6, 18, 19]. В передних рогах PARV экспрессируется достаточно большим количеством интернейронов [13, 20, 21]. У человека этот Са-связывающий белок присутствует в 63 % спинальных мотонейронов [22].

Актуальность изучения PARV+ нейронов на модели ТСМ обусловлена уже имеющимися данными о том, что уровень экспрессии PARV отрицательно коррелирует с уязвимостью нейронов к повреждению. Дефицит Са-связывающих белков PARV и кальбиндина D28K делает мотонейроны особенно чувствительными к гиперкальциевой токсичности в результате активации глутаматных рецепторов [23].

Интерес к OPN связан с его способностью поддерживать контролируемые нейротрофинами внутриклеточные сигнальные каскады в процессе регенерации аксонов в ЦНС [24]. Гиперэкспрессия OPN индуцирует возобновление роста аксонов зрительного нерва и образование функционирующих синапсов в верхних холмиках [25]. OPN рассматривается в качестве маркера мотонейронов в спинном мозге [26]. OPN обнаружен примерно у 70 % крупных холинацетилтрансфераза-(ChAT) иммунопозитивных мотонейронов [26], контролируя их резистентность при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) путем модуляции экспрессии матричной металлопротеиназы 9 (MMP9) [27].

Одна из разновидностей протеогликанов, контролирующих пролиферацию и дифференцировку клеток многих типов, представлена гепарансульфат протеогликанами, которые включают глипиканы (GPCs) [28]. GPCs представлены семейством эволюционно консервативных белков, связанных с мембраной нейронов при помощи гликозилфосфатидилинозитола.

У крысы методом гибридизации *in situ* показана экспрессия GPCs в нейронах центральной и периферической нервной системы [29]. Другим источником GPCs служат астроциты. Так, секретируемый астроцитами GPC4 индуцирует образование активных возбуждающих синапсов путем рекрутирования глутаматных рецепторов AMPA на постсинаптической мембране, а также стимулирует высвобождение из пресинаптических окончаний нейронального пентраксина 1, фактора кластеризации рецепторов

АМРА, путем передачи сигналов через пресинаптическую рецепторную протеинтирозинфосфатазу дельта (RPTPδ) [30].

GPCs взаимодействуют со многими растворимыми и нерастворимыми лигандами. Среди них хемокины, морфогены, факторы роста, рецепторы, синаптогенные молекулы и молекулы внеклеточного матрикса [31, 32]. GPCs вместе с другими многочисленными секретируемыми синаптическими организаторами в ЦНС участвуют в опосредованном астроцитами синаптогенезе и регуляции синаптической активности [30, 33–35]. Участие GPCs в процессах нейропластичности и нейрорегенерации при TCM остается практически неизученным.

Цель нашего исследования – установление возможных сдвигов в экспрессии функционально значимых белков PARV, OPN и GPC4 в нейронах VII, VIII и IX пластинки в передних рогах серого вещества поясничного отдела спинного мозга крысы в остром и хроническом периоде при дозированной контузионной TCM в грудном отделе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В эксперименте использовали взрослых самок крыс линии Wistar (250–300 г, $n = 15$). Животные были случайным образом разделены на интактные (контрольные, $n = 5$) и экспериментальные ($n = 10$) группы. Крыс содержали в стандартных условиях (12-часовой цикл освещения) с питанием, доступным *ad libitum*.

Моделирование TCM

После внутримышечной инъекции золетила (20 мг/кг, Virbac Sante Animale, Франция) экспериментальных крыс подвергали глубокой анестезии изофлураном. Рассекали фасцию и параостистые мышцы, после чего выполняли ламинэктомию на уровне 8-го грудного (VTh8) позвонка, соответствующего сегменту Th8. TCM высокой степени тяжести (4 м/с) воспроизводили с помощью импактора Impact One Stereotaxic Impactor (Leica, Германия). После воспроизведения TCM животным вводили энрофлоксацин (2.5 мг/кг, Livisto, Испания) внутримышечно один раз в день в течение 7 дней после TCM. Мочевые пузыри опорожняли вручную дважды в день до начала самостоятельного мочеиспускания.

Иммунофлуоресцентный анализ

Крыс на 7-е и 60-е сутки после TCM ($n = 5$ крыс в каждой группе) анестезировали хлоралгидратом, затем транскардиально последовательно перфузировали холодным (4 °C) фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7.4) и 4%-ным забуференным формалином (BioVitrum, Россия). Указанные сроки соответствуют острому и хроническому периоду TCM крысы. После перфузии выделяли позвоночный столб с последующей фиксацией в течение 12 ч в 4%-ном забуференном формалине, затем аккуратно извлекали из него фрагмент спинного мозга, соответствующий сегментам L3–4 поясничного отдела, и подвергали криоконсервации в градиенте сахарозы (15% и 30%). Далее получали срезы толщиной 20 мкм с использованием криостата FS800A (RWD Life Science Co., КНР). Для прицельного исследования передних рогов в поясничном отделе спинного мозга после травмы на уровне VTh8 использовали поперечные срезы спинного мозга, соответствующие сегментам L3–4.

Для иммунофлуоресцентного анализа нейронов срезы спинного мозга блокировали 5%-ной нормальной ослиной сывороткой (NDS) в течение 30 мин при комнатной температуре (RT), затем инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами против PARV (1: 400, Sigma-Aldrich, P3088, США), OPN (1: 200, Cloud-Clone Corp., PAA899Ra01, КНР), GPC4 (1: 100, Cloud-Clone Corp., PAA998Ra01, КНР), ядра кле-

ток окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich, D9542, США). Вторичные антитела, меченные флуорофором, инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. NDS, первичные и вторичные антитела разводили в 0.1%-ном Triton X-100 в PBS. Срезы заключали на предметные стекла с использованием заключающей среды ImmunoHistoMount (Abcam, ab104135, США). Срезы, инкубированные только со вторичными антителами (без первичных антител), использовали в качестве контроля реакции. Срезы исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия). Обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Zen 2012 (Carl Zeiss, Германия), количественный анализ нейронов в пластинках осуществляли ручным методом при помощи маски, накладываемой на изображения (рис. 1).

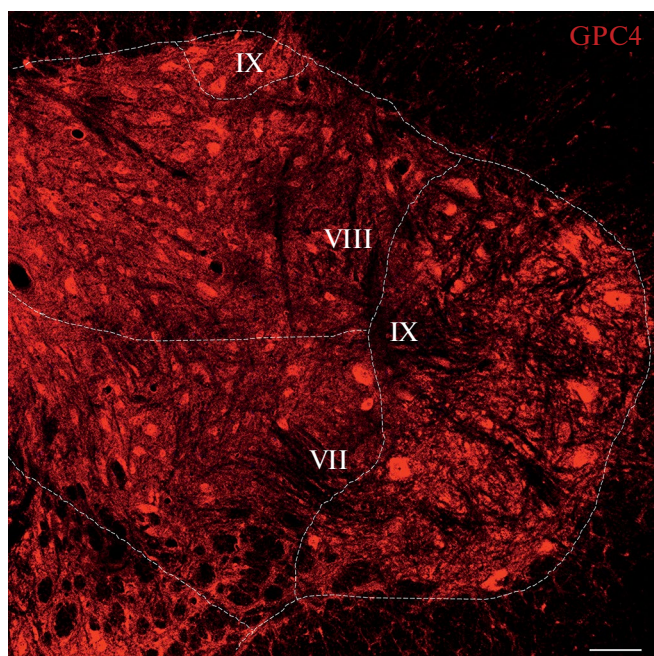


Рис. 1. Иммунофлуоресцентный анализ. Визуализация экспрессии GPC4 в различных пластинках (VII, VIII, IX) передних рогов в поясничном отделе (сегменты L3–4) спинного мозга крысы. Масштаб: 100 мкм (10×).

Для количественного анализа все срезы были получены с использованием идентичных настроек конфокального микроскопа («laser intensity», «gain», «offset»). На конфокальных изображениях во всей области передних рогов измеряли интегральную интенсивность флуоресценции GPC4 аналогично описанному ранее методу [36]. Количественный подсчет клеток и анализ интегральной интенсивности флуоресценции производили на пяти серийных срезах, полученных от каждой крысы, в области передних рогов на уровне сегментов L3–4. Исследования проводились двумя наблюдателями для обеспечения правильной идентификации иммуореактивности. Оба исследователя были «ослеплены» относительно экспериментальных и контрольных групп. Дополнительно нами было отмечено отсутствие сдвигов в характере и интенсивности флуоресценции в реакции с антителами против GPC4 в сериях как с предварительной пермеабиллизацией срезов, так и без нее, что указывает на присутствие искомого антигена в цитоплазме нейронов.

Статистический анализ

Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Origin 7.0 SR0 (OriginLab, США). Результаты были представлены в виде ящиков с “усами” (боксплотов) и столбчатых диаграмм и выражены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD). Для различных сравнений между всеми экспериментальными и контрольными группами был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с тестом Тьюки. Тест Крускала – Уоллиса использовали для проверки общей разницы в медианных уровнях между группами, при этом для множественных сравнений применяли поправку Данна. Средние различия между экспериментальными группами считали значимыми при достижении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пластинка VII. В отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе (сегменты L3–4) выявлено уменьшение количества PARV+ нейронов в ~ 2 раза ($p < 0.05$) как на 7-е, так и на 60-е сутки после нанесения травмы в грудном отделе (рис. 2a). При этом в сегментах L3–4 количество нейронов, экспрессирующих OPN, оставалось неизменным на обоих сроках наблюдения (рис. 2b). Количество экспрессирующих GPC4 нейронов (рис. 2c) возрастало на 7-е сутки (в 1.4 раза при сравнении с интактным контролем и в 6 раз при сравнении с показателем на 60-е сутки, $p < 0.05$). К 60-м суткам этот показатель существенно уменьшался (в 4.3 раза при сравнении с интактным контролем и в 6 раз при сравнении с показателем на 7-е сутки, $p < 0.05$).

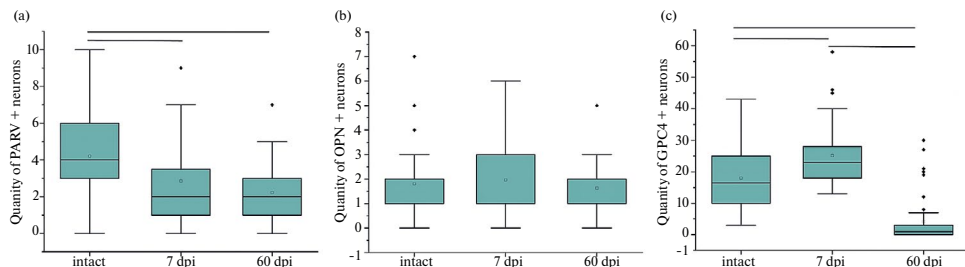


Рис. 2. Количество (a) PARV+, (b) OPN+, (c) GPC4+ нейронов в VII пластинке передних рогов в поясничном отделе (сегменты L3–4) интактного (intact) и травмированного на уровне грудного отдела (сегмент Th8) спинного мозга крысы на 7-е и 60-е сутки после повреждения (7 и 60 dpi – days post injury); $p < 0.05$, тест Крускала – Уоллиса.

Уменьшение количества нейронов, экспрессирующих PARV, в пластинке VII может быть связано с гибелью или дисфункцией интернейронов задних ядер Кларка и нейронов промежуточных ядер вследствие травмы. Это предположение кажется менее вероятным, чем просто уменьшение экспрессии PARV в переживающих нейронах пластинки VII в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе. В ряде работ с ТСМ в грудном отделе гибель нейронов в отдаленном поясничном отделе не была обнаружена [37–39]. Стабильность количества нейронов, экспрессирующих OPN, с учетом не обнаруженных нами изменений данного показателя в пластинке VII можно интерпретировать как признак их устойчивости к травматическому повреждению.

В исследуемой области (сегменты L3–4) нами выявлено увеличение количества GPC4+ нейронов на 7-е сутки (в 1.4 раза при сравнении с интактным контролем, в 6 раз при сравнении с 60-ми сутками, $p < 0.05$) и уменьшение к 60-м суткам (в 4.3 раза

при сравнении с интактным контролем, в 6 раз при сравнении с 7-ми сутками, $p < 0.05$). Преходящее увеличение количества нейронов, экспрессирующих GPC4, в острый период ТСМ на уровне сегментов L3–4 может быть связано с реакцией на повреждение, направленной на поддержание или восстановление функций спинного мозга, с последующим снижением экспрессии GPC4 в хроническом периоде из-за истощения компенсаторных механизмов.

Пластинка VIII. На уровне сегментов L3–4 поясничного отдела на обоих сроках наблюдения не выявлено изменение количества PARV+ и OPN+ нейронов (рис. 3а, б). Для GPC4+ нейронов, так же как и в пластинке VII, установлено значительное уменьшение их количества (рис. 3с) к 60-м суткам эксперимента (в 4.6 и 5 раз при сравнении с интактным контролем и показателем на 7-е сутки соответственно, $p < 0.05$).

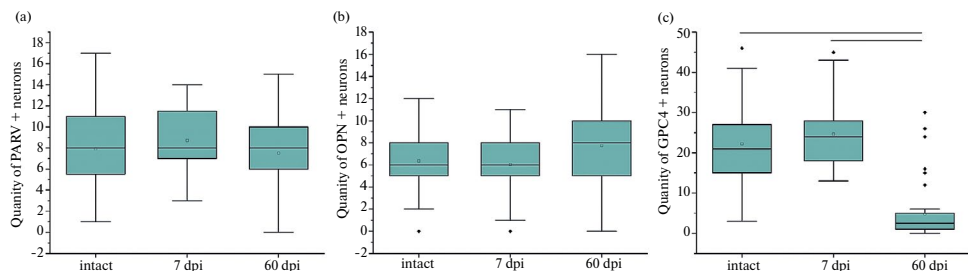


Рис. 3. Количество (а) PARV+, (б) OPN+, (с) GPC4+ нейронов в VIII пластинке передних рогов в поясничном отделе (сегменты L3–4) интактного (intact) и травмированного на уровне грудного отдела (сегмент Th8) спинного мозга крысы на 7-е и 60-е сутки после повреждения (7 и 60 dpi – days post injury); $p < 0.05$, тест Крускала – Уоллиса.

Стабильность количества PARV+ и OPN+ нейронов в пластинке VIII может свидетельствовать о том, что мотонейроны заднелатерального и заднемедиального ядер, а также нейроны собственного ядра переднего рога в отдаленном от эпицентра травмы поясничном отделе длительно поддерживают свой фенотип и менее чувствительны к повреждению в острой и хронической фазе ТСМ. Значительное уменьшение количества нейронов, экспрессирующих GPC4, к 60-м суткам на уровне сегментов L3–4 указывает на возможные долговременные изменения в их функционировании.

Пластинка IX. В пределах данной пластинки на уровне сегментов L3–4 установлено уменьшение в ~1.8 раза ($p < 0.05$) количества PARV+ нейронов как на 7-е, так и на 60-е сутки после нанесения травмы (рис. 4а). В этом материале так же, как и в пластинках VII и VIII, изменения в количестве OPN+ нейронов не выявлены (рис. 4б). Количество GPC4+ нейронов возрастало на 7-е сутки (в 1.3 и 3.4 раза при сравнении с интактным контролем и показателем на 60-е сутки соответственно) и существенно снижалось на 60-е сутки после повреждения (в 2.5 и 3.4 раза при сравнении с интактным контролем и 7-ми сутками соответственно) (рис. 4с).

Уменьшение количества PARV+ нейронов в пластинке IX может быть связано с повреждением или дисфункцией как крупных альфа-мотонейронов, так и малых гамма-мотонейронов в переднемедиальном и переднелатеральном ядрах. Это указывает на значительное влияние травмы на эти популяции нейронов. Отсутствие изменений в количестве OPN+ нейронов во всех исследуемых пластинках свидетельствует о том, что данные нейронные популяции остаются стабильными и могут быть в меньшей степени подвержены повреждению, реализуя эффективные механизмы компенсации.

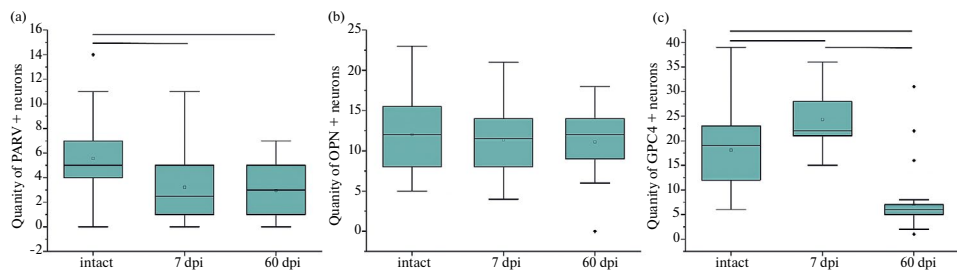


Рис. 4. Количество (а) PARV+, (b) OPN+, (с) GPC4+ нейронов в IX пластинке передних рогов в поясничном отделе (сегменты L3–4) интактного (intact) и травмированного на уровне грудного отдела (сегмент Th8) спинного мозга крысы на 7-е и 60-е сутки после повреждения (7 и 60 dpi – days post injury); $p < 0.05$, тест Крускала – Уоллиса.

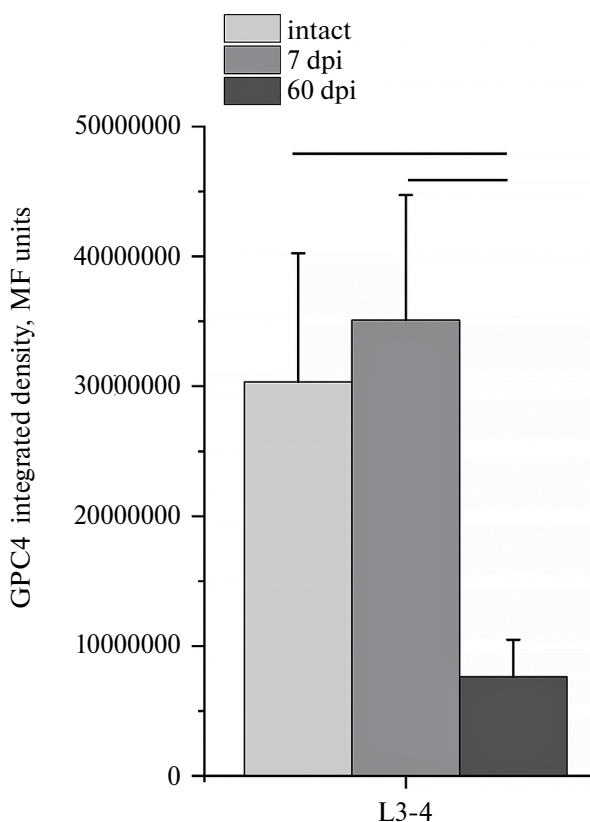


Рис. 5. Изменение интегральной интенсивности флуоресценции (единицы MIF – mean intensity of fluorescence) GPC4 в передних рогах поясничного отдела (сегменты L3–4) спинного мозга интактного (intact) и травмированного на уровне грудного отдела (сегмент Th8) спинного мозга крысы на 7-е и 60-е сутки после повреждения (7 и 60 dpi – days post injury); $p < 0.05$, тест Тьюки.

Аналогичная, как и в других пластинках в передних рогах спинного мозга, динамика увеличения количества GPC4+ нейронов на 7-е сутки, а затем их значительное снижение к 60-м суткам может отражать адаптивные изменения нейронов этих популяций в ответ на травму.

Интегральная интенсивность флуоресценции GPC4 в передних рогах спинного мозга в сегментах L3–4 демонстрирует тенденцию к некоторому увеличению на 7-е сутки и значительно снижается к 60-м суткам (в 3.9 и в 4.6 раз по сравнению с интактным контролем и показателем на 7-е сутки соответственно, $p < 0.05$) (рис. 5).

Таким образом, полученные данные по экспрессии PARV (рис. 6а), OPN (рис. 6б) и GPC4 (рис. 6с) в нейронах конкретных популяций в разных пластинках передних рогов серого вещества в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе спинного мозга свидетельствуют о сложных механизмах адаптации нейронов различных популяций в этом отделе серого вещества.

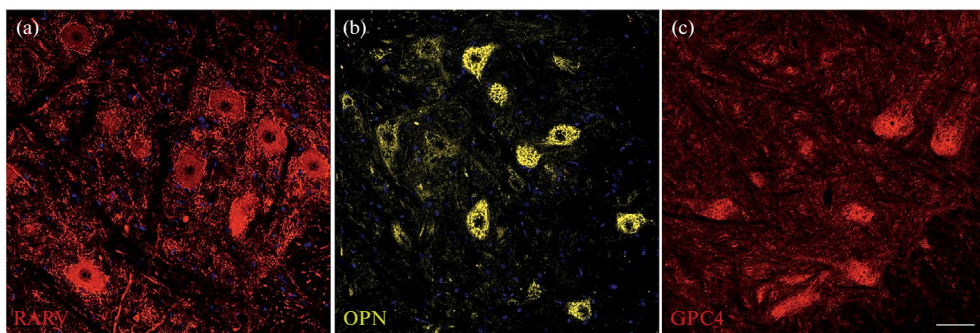


Рис. 6. Иммунофлуоресцентный анализ. Визуализация экспрессии (а) PARV (красным), (б) OPN (желтым) и (с) GPC4 (красным) в передних рогах (пластинка IX) поясничного отдела (сегменты L3–4) спинного мозга крысы. Масштаб: 50 мкм (20×).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отдаленное повреждение – это многофакторное явление, в котором такие компоненты, как нейровоспаление, окислительный стресс, эксайтотоксическое повреждение, уменьшение количества синапсов и снижение экспрессии маркеров активности нейронов, проявляются в определенные сроки. Каждый из этих компонентов и взаимодействие между ними влияют на поведение нейральных клеток и функциональные результаты.

В пластинках VII и IX в острую и хроническую фазу ТСМ нами показано уменьшение количества PARV+ нейронов, что может указывать на снижение связывания кальция в нейронах отдаленного от эпицентра повреждения поясничного отдела спинного мозга. Эти изменения могут совпадать со снижением экспрессии маркеров активности нейронов в отдаленном отделе, например, таких как c-fos и Ca/кальмодулин-зависимая-протеинкиназа II альфа (CaMK2a) [40]. Сдвиги в количестве иммунопозитивных нейронов можно надежно зарегистрировать при достаточно выраженном их количестве в определенном объеме ткани. Численность популяции образующих комиссуральные и propriospinalные связи PARV+ нейронов в пластинке VIII менее многочисленна по сравнению с другими пластинками, например, V–VI [17]. Можно предположить, что именно поэтому нам не удалось зарегистрировать сдвиги в количестве PARV+ нейронов в пластинке VIII. На важность поддержания экспрессии PARV для выживания

нейронов указывают данные исследований на mSOD1 мутантных мышах с моделью БАС. На этой модели сверхэкспрессия PARV значительно сдерживала гибель мотонейронов, наблюдаемую в результате эксайтотоксического повреждения [41]. Методом гибридизации *in situ* показана активная экспрессия мРНК гена *Parv* в пуле резистентных к БАС мотонейронов. При этом в мотонейронах чувствительных к БАС популяций измеримая экспрессия PARV не обнаружена. Для других Са-связывающих белков, таких как кальбиндин D28K, кальретинин и кальмодулин, установлен одинаковый уровень экспрессии в различных моторных пулах. Эти наблюдения позволяют рассматривать PARV в качестве специфического маркера резистентных к БАС мотонейронов и формируют представление о механизмах устойчивости мотонейронов к дегенерации [42]. Таким образом, наши данные по снижению экспрессии PARV в нейронах пластинок VII и IX могут указывать на повышение риска их повреждения и усиления дефицита двигательной функции.

Мы впервые изучили характер экспрессии OPN в нейронах отдаленного от эпицентра травматического повреждения поясничного отдела спинного мозга. Во всех изученных пластинках в передних рогах серого вещества нами не отмечены сдвиги в количестве OPN+ нейронов как в острой, так и в хронической фазе TCM. Полученные в настоящей работе данные можно интерпретировать как то, что посттравматические сдвиги в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе могут не затрагивать всю популяцию нейронов в передних рогах, и если они проявляются, то только в поздние сроки TCM.

Показанное в пластинке IX в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе спинного мозга увеличение количества GPC4+ нейронов в остром посттравматическом периоде может отражать реакции восстановления функции нейронных сетей. Эти данные можно рассматривать в ключе позитивной приспособительной реакции нейронов в отдаленном от эпицентра повреждения поясничном отделе спинного мозга. Оценка этой реакции как позитивной основана на данных о связывании заякоренного на поверхности нейрона GPC4 с различными молекулами, обладающими нейротрофической активностью и стимулирующими нейрорегенерацию, такими как нейротрофические факторы [43] и синаптогенные молекулы [32].

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Ч. Ю. А. и М. Я. О.), сбор данных (Т. О. Н., К. И. М.), обработка данных (Т. О. Н., К. И. М.), написание и редактирование манускрипта (Ч. Ю. А., К. И. М., Т. О. Н., М. Я. О.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 23–25–00002), <https://rscf.ru/project/23–25–00002>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 43 от 24.10.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Czeiter E, Pal J, Kovesdi E, Bukovics P, Luckl J, Doczi T, Buki A* (2008) Traumatic axonal injury in the spinal cord evoked by traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 25: 205–213.
<https://doi.org/10.1089/neu.2007.0331>
2. *Freund P, Curt A, Friston K, Thompson A* (2013) Tracking changes following spinal cord injury: Insights from neuroimaging. *Neuroscientist* 19: 116–128.
<https://doi.org/10.1177/1073858412449192>
3. *Bisicchia E, Latini L, Cavallucci V, Sasso V, Nicolini V, Molinari M, D'Amelio M, Viscomi MT* (2017) Autophagy Inhibition Favors Survival of Rubrospinal Neurons After Spinal Cord Hemisection. *Mol Neurobiol* 54: 4896–4907.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0031-z>
4. *Chelyshev Y* (2022) More Attention on Segments Remote from the Primary Spinal Cord Lesion Site. *Front Biosci – Landmark* 27: 235.
<https://doi.org/10.31083/j.fbl2708235>
5. *Nardone R, Trinka E* (2015) Reorganization of spinal neural circuitry and functional recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 10: 201–202.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.152368>
6. *Smith AC, Knikou M* (2016) A Review on Locomotor Training after Spinal Cord Injury: Reorganization of Spinal Neuronal Circuits and Recovery of Motor Function. *Neural Plast* 2016: 1216258.
<https://doi.org/10.1155/2016/1216258>
7. *Yang B, Zhang F, Cheng F, Ying L, Wang C, Shi K, Wang J, Xia K, Gong Z, Huang X, Yu C, Li F, Liang C, Chen Q* (2020) Strategies and prospects of effective neural circuits reconstruction after spinal cord injury. *Cell Death Dis* 11: 439.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2620-z>
8. *Wang Y, Wu W, Wu X, Sun Y, Zhang YP, Deng LX, Walker MJ, Qu W, Chen C, Liu NK, Han Q, Dai H, Shields LBE, Shields CB, Sengelaub DR, Jones KJ, Smith GM, Xu XM* (2018) Remodeling of lumbar motor circuitry remote to a thoracic spinal cord injury promotes locomotor recovery. *Elife* 7: e39016.
<https://doi.org/10.7554/eLife.39016>
9. *Beauparlant J, Van Den Brand R, Barraud Q, Friedli L, Musienko P, Dietz V, Courtine G* (2013) Undirected compensatory plasticity contributes to neuronal dysfunction after severe spinal cord injury. *Brain* 136: 3347–3361.
<https://doi.org/10.1093/brain/awt204>
10. *Hou S, Duale H, Cameron AA, Abshire SM, Lyttle TS, Rabchevsky AG* (2008) Plasticity of lumbosacral propriospinal neurons is associated with the development of autonomic dysreflexia after thoracic spinal cord transection. *J Comp Neurol* 509: 382–399.
<https://doi.org/10.1002/cne.21771>
11. *Dougherty KJ, Hochman S* (2008) Spinal cord injury causes plasticity in a subpopulation of lamina I GABAergic interneurons. *J Neurophysiol* 100: 212–223
12. *Matson KJE, Russ DE, Kathe C, Hua I, Maric D, Ding Y, Krynskiy J, Pursley R, Sathiyamurthy A, Squair JW, Levi BP, Courtine G, Levine AJ* (2022) Single cell atlas of spinal cord injury in mice reveals a pro-regenerative signature in spinocerebellar neurons. *Nat Commun* 13: 5628.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-33184-1>
13. *Antal M, Polgár E, Chalmers J, Minson JB, Llewellyn-Smith I, Heizmann CW, Somogyi P* (1991) Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 314: 114–124.
<https://doi.org/10.1002/cne.903140111>
14. *Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, Schmidt HHHW* (1994) Subpopulations of gabaergic neurons in laminae i-iii of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience* 61: 123–132.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90065-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90065-5)
15. *Chakrabarty S, Shulman B, Martin JH* (2009) Activity-dependent codevelopment of the corticospinal system and target interneurons in the cervical spinal cord. *J Neurosci* 29: 8816–8827.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-09.2009>
16. *Ma X, Mirauccourt LS, Qiu H, Sharif-Naeini R, Khadra A* (2023) Modulation of SK Channels via Calcium Buffering Tunes Intrinsic Excitability of Parvalbumin Interneurons in Neuropathic Pain: A Computational and Experimental Investigation. *J Neurosci* 43: 5608–5622.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0426-23.2023>

17. *Veshchitskii A, Merkulyeva N* (2023) Calcium-binding protein parvalbumin in the spinal cord and dorsal root ganglia. *Neurochem Int* 171: 105634.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105634>
18. *Chen B, Li Y, Yu B, Zhang Z, Brommer B, Williams PR, Liu Y, Hegarty SV, Zhou S, Zhu J, Guo H, Lu Y, Zhang Y, Gu X, He Z* (2018) Erratum: Reactivation of Dormant Relay Pathways in Injured Spinal Cord by KCC2 Manipulations *Cell* 174(3):521–535.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.050>
19. *Khalki L, Sadlaoud K, Lerond J, Coq JO, Brezun JM, Vinay L, Coulon P, Bras H* (2018) Changes in innervation of lumbar motoneurons and organization of premotor network following training of transected adult rats. *Exp Neurol* 299: 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.09.002>
20. *Antal M, Freund TF, Polgár E* (1990) Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 295: 467–484.
<https://doi.org/10.1002/cne.902950310>
21. *Ren K, Ruda MA* (1994) A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Res Rev* 19: 163–179.
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90010-8)
22. *Fahandejsaadi A, Leung E, Rahaii R, Bu J, Geula C* (2004) Calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in primate lower motor neurons. *Neuroreport* 15: 443–448.
<https://doi.org/10.1097/00001756-200403010-00012>
23. *Shaw PJ, Eggett CJ* (2000) Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Suppl* 247: 17–27.
<https://doi.org/10.1007/s004150050553>
24. *Weng Y, Lu F, Li P, Jian Y, Xu J, Zhong T, Guo Q, Yang Y* (2024) Osteopontin Promotes Angiogenesis in the Spinal Cord and Exerts a Protective Role Against Motor Function Impairment and Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 49: E142–E151.
<https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000004954>
25. *Bei F, Lee HHC, Liu X, Gunner G, Jin H, Ma L, Wang C, Hou L, Hensch TK, Frank E, Sanes JR, Chen C, Fagioliini M, He Z* (2016) Restoration of Visual Function by Enhancing Conduction in Regenerated Axons. *Cell* 164: 219–232.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.036>
26. *Misawa H, Hara M, Tanabe S, Niikura M, Moriwaki Y, Okuda T* (2012) Osteopontin is an alpha motor neuron marker in the mouse spinal cord. *J Neurosci Res* 90: 732–742.
<https://doi.org/10.1002/jnr.22813>
27. *Morisaki Y, Niikura M, Watanabe M, Onishi K, Tanabe S, Moriwaki Y, Okuda T, Ohara S, Murayama S, Takao M, Uchida S, Yamanaka K, Misawa H* (2016) Selective expression of osteopontin in ALS-resistant motor neurons is a critical determinant of late phase neurodegeneration mediated by matrix metalloproteinase-9. *Sci Rep* 6: 27354.
<https://doi.org/10.1038/srep27354>
28. *Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD* (2011) Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–33.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>
29. *Litwack ED, Stipp CS, Kumbasar A, Lander AD* (1994) Neuronal expression of glypican, a cell-surface glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan, in the adult rat nervous system. *J Neurosci* 14: 3713–3724.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-06-03713.1994>
30. *Farhy-Tselnicker I, van Casteren ACM, Lee A, Chang VT, Aricescu AR, Allen NJ* (2017) Astrocyte-Secreted Glypican 4 Regulates Release of Neuronal Pentraxin 1 from Axons to Induce Functional Synapse Formation. *Neuron* 96: 428–445.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.053>
31. *Kaur SP, Cummings BS* (2019) Role of glypicans in regulation of the tumor microenvironment and cancer progression. *Biochem Pharmacol* 168: 108–118.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.020>
32. *Kamimura K, Maeda N* (2021) Glypicans and Heparan Sulfate in Synaptic Development, Neural Plasticity, and Neurological Disorders. *Front Neural Circuits* 15: 595596.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2021.595596>
33. *Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, Wang GX, Chakraborty C, Smith SJ, Barres BA* (2012) Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486: 410–414.
<https://doi.org/10.1038/nature11059>

34. *Yuzaki M* (2018) Two Classes of Secreted Synaptic Organizers in the Central Nervous System. *Annu Rev Physiol* 80: 243–262.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121322>
35. *Lee E, Chung WS* (2019) Glial control of synapse number in healthy and diseased brain. *Front Cell Neurosci* 13: 42.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00042>
36. *Kabdeshe IM, Mukhamedshina YO, Arkhipova SS, Sabirov DK, Kuznecov MS, Vyshakalyuk AB, Rizvanov AA, James V, Chelyshev YA* (2022) Cellular and Molecular Gradients in the Ventral Horns With Increasing Distance From the Injury Site After Spinal Cord Contusion. *Front Cell Neurosci* 16.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.817752>
37. *McBride RL, Feringa ER* (1992) Ventral horn motoneurons 10, 20 and 52 weeks after T-9 spinal cord transection. *Brain Res Bull* 28: 57–60.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90230-U](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90230-U)
38. *Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Maeda T, Katoh H, Ohkawa Y, Nakashima Y, Okada S* (2019) Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. *Mol Brain* 12: 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s13041-018-0422-3>
39. *García-Álías G, Torres-Espín A, Vallejo C, Navarro X* (2010) Functional involvement of the lumbar spinal cord after contusion to T8 spinal segment of the rat. *Restor Neurol Neurosci* 28: 781–792.
<https://doi.org/10.3233/RNN-2010-0549>
40. *Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Maeda T, Katoh H, Ohkawa Y, Nakashima Y, Okada S* (2019) Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. *Mol Brain* 12: 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s13041-018-0422-3>
41. *Spruill MM, Kuncel RW* (2015) Calbindin-D28K is increased in the ventral horn of spinal cord by neuroprotective factors for motor neurons. *J Neurosci Res* 93: 1184–1191.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23562>
42. *Elliott JL, Snider WD* (1995) Parvalbumin is a marker of ALS-resistant motor neurons. *Neuroreport* 6: 449–452.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199502000-00011>
43. *Oikari LE, Yu C, Okolicsanyi RK, Avgan N, Peall IW, Griffiths LR, Haupt LM* (2020) HSPGs glypican-1 and glypican-4 are human neuronal proteins characteristic of different neural phenotypes. *J Neurosci Res* 98: 1619–1645.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24666>

Expression of Parvalbumin, Osteopontin and Glypican4 in Neurons of Lumbar Region Distant from the Epicenter of Traumatic Spinal Cord Injury

O. N. Tutova^a, I. M. Kabdesh^{a, #}, Ya. O. Mukhamedshina^{a, b}, and Yu. A. Chelyshev^{a, b}

^aKazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

^bKazan State Medical University, Kazan, Russia

[#]e-mail: ikabdeshe@gmail.com

Spinal cord injury (SCI) is manifested by pathologic changes in the areas significantly distant from the area of primary injury. In order to find new potential therapeutic targets to restore motor function, it is particularly relevant to identify the causes and mechanisms of these shifts in the lumbar spinal cord when injury occurs in the proximal spinal cord. On the model of dosed SCI the expression of Ca-binding protein parvalbumin (PARV), osteopontin (OPN) and glypican 4 (GPC4) in neurons of laminae VII, VIII and IX within segments L3–4 on 7 and 60 days of the experiment was studied. Laminas VII and IX show a decrease in the number of PARV+ neurons during the acute and chronic phase of SCI, which may indicate a decrease in calcium binding in ventral horn neurons at the level of segments L3–4. Decreased PARV expression in these neurons indicates an increased risk of their vulnerability and impaired motor function. The pattern of OPN expression in lumbar horn neurons distant from the epicenter of traumatic injury was studied for the first time. In all the studied laminae in the ventral horns of the gray matter, we did not observe shifts in the number of OPN+ neurons both in the acute and chronic phases of SCI. In lamina IX of the lumbar spinal cord, we found an increase in the number of GPC4+ neurons in the acute posttraumatic period, which can be regarded as a key positive adaptive reaction of neurons in the lumbar spinal cord remote from the epicenter of injury. The assessment of this reaction as positive is based on the data on the binding of GPC4 anchored on the neuron surface to various molecules with neuroprotective activity and stimulating neuroregeneration.

Keywords: spinal cord injury, remote injury, parvalbumin, osteopontin, glypican

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

2-АРВ ПРЕДОТВРАЩАЕТ АТРОФИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И МЕНЯЕТ КЛЕТОЧНЫЙ СИГНАЛИНГ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ

M. SOLEUS КРЫС

© 2024 г. К. А. Зарипова¹, Р. О. Боков¹, К. А. Шарло¹, С. П. Белова¹,
Т. Л. Немировская^{1,*}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: Nemirovskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 11.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принята к публикации 15.08.2024 г.

IP3-рецепторы (IP3R) находятся в значительном количестве в мышечных волокнах в саркоплазматическом ретикулуме, ядре и митохондриях. Мы предположили, что активация IP3R при разгрузке мышц может вызывать слабый сигнал высвобождения кальция как цитозольный, так и нуклеоплазматический, который способствует (возможно, с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов, что приводит к экспрессии или репрессии генов, участвующих в фенотипе мышц. Эту гипотезу проверяли, применив блокирование IP3R во время функциональной разгрузки мышц крыс путем введения 2-АРВ (2-aminoethoxydiphenyl borate). Мы обнаружили, что состояние IP3R влияет на развитие атрофических процессов постральной *m. soleus* при вывешивании крыс. Введение блокатора IP3R2-АРВ животным успешно предотвращало снижение площади поперечного сечения *m. soleus* как быстрых, так и медленных мышечных волокон. Замедление снижения площади поперечного сечения мышечных волокон *m. soleus* при введении ингибитора IP3R на фоне 7-суточной функциональной разгрузки связано с предотвращением снижения рибосомального биогенеза и повышения экспрессии маркера аутофагии ULK-1 и IL-6.

Ключевые слова: скелетная мышца, атрофия, IP3-рецепторы

DOI: 10.31857/S0869813924090084, EDN: AJUMSN

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная разгрузка скелетных мышц включает в себя отсутствие или же значительное снижение активности мышц, а также механической нагрузки на мышцу. Такое состояние в той или иной степени наблюдается в условиях постельной гипокинезии, гипсовой иммобилизации конечностей при травмах, а также в условиях микрогравитации при космическом полете. В лабораторных условиях функциональную разгрузку изучают с использованием модели вывешивания задних конечностей грызунов [1]. Функциональная разгрузка приводит к развитию атрофии и слабости мышц, которые сохраняются достаточно долгое время после возвращения к нормальному режиму активности. Молекулярные механизмы развития этих процессов изучены не-

достаточно, в частности, роль кальций-зависимых сигнальных путей. При функциональной разгрузке мышц обнаружено накопление ионов Ca^{2+} в мышечных волокнах [2, 3] и в миоцитах [4], а активация кальций-зависимых протеаз кальпаинов вносит существенный вклад в деградацию цитоскелетных белков камбаловидной мышцы [5]. Похожее накопление кальция в миоплазме происходит при ряде патологических состояний, таких как старение или различные миодистрофии [6, 7], и может вносить вклад в развитие атрофических процессов. Помимо непосредственного участия в атрофии за счет активации протеолиза, кальций может работать и как регулятор транскрипции генов [8].

Ионы кальция при разгрузке мышц поступают в саркоплазму из саркоплазматического ретикулума (СР) в ответ на деполяризацию мышечной мембраны через механизм сопряжения DHPR/RyR (дигидропиридиновые рецепторы/рианодиновые каналы) [9]. IP₃-рецепторы (IP₃R) также находятся в СР, митохондриях, а также в ядре и в дополнение к поглощению Ca^{2+} в СР, регулируют обмен кальция с ядром [10, 11]. Пропускная способность IP₃R регулируется ионами Ca^{2+} и IP₃, при этом в зависимости от концентрации IP₃ IP₃R варьируют силу кальциевого сигнала [12]. IP₃ вырабатывается после активации различных рецепторов плазматической мембраны клетки внеклеточными сигналами [13]. SERCA (саркоплазматическая Ca^{2+} -АТФаза) играет ключевую роль в удалении ионов кальция из СР и ее активность при разгрузке мышц снижена [14, 15]. Мы полагаем, что снижение ее активности при разгрузке мышц может вносить дополнительный вклад в накопление кальция в мышечных волокнах. Высвобождение Ca^{2+} , вызванное деполяризацией клеток скелетных мышц, можно разделить на два независимых компонента: быстрый транзитный Ca^{2+} , равномерно распределенный по клетке, что соответствует сопряжению возбуждения и сокращения, и медленный транзитный Ca^{2+} с отчетливым ядерным компонентом, генерируемый IP₃ [16]. «Медленный» Ca^{2+} может стимулировать активацию внутриклеточных сигнальных путей и мышечную атрофию, а также участвует в сопряжении возбуждения и транскрипции [17–19]. Термин «медленный» кальций относится к ионам Ca^{2+} , повышенная концентрация которых не связана с сокращением и сохраняется в саркоплазме в течение длительного времени (пик достигается через 60–100 с и в основном связан с ядрами клеток). В работах [20, 21] в экспериментах на культуре миотуб было обнаружено, что медленные кальциевые процессы опосредованы IP₃, но не RyR. В работах с участием Jaimovich (2000–2023 гг.) показано, что IP₃R необходимы для нормальной активности скелетных мышц, оказывая свое действие путем регулирования экспрессии генов, энергетического обмена и активности митохондрий. Мы полагаем, что при функциональной разгрузке скелетных мышц механизм генерации IP₃ может осуществляться посредством активации метаболитных пуриnergических рецепторов P₂Y внеклеточным АТФ, высвобождаемым через механизм, зависимый от паннексина 1, сопряженного с работой сенсора напряжения DHPR. Ранее аналогичный механизм был описан в лаборатории Jaimovich в экспериментах на культуре миотуб, мышечных волокон, а также в модели mdx мышей [20, 22–24]. Инактивация Na, K-АТФазы при разгрузке мышц приводит к деполяризации сарколеммы [9], что, в свою очередь, вызывает активацию DHPR [25] и открытие RyR. DHPR соединены в сарколемме с паннексинами каналами. Нами показано, что при функциональной разгрузке АТФ из мышцы через паннексинальные каналы может выходить во внеклеточное пространство [26]. Эти нуклеотиды затем могут взаимодействовать с каналами P₂Y (G protein Y-coupled receptors) [27]. Известно, что они активируют P₁₃ K gamma (P₁₃K) (в T-каналах мембраны) и в конечном итоге запускают образование инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃). Затем IP₃ может связываться с IP₃R, присутствующими в саркоплазматической сети, митохондриях и в ядерной мембране, вызывая высвобождение кальция в нуклеоплазме, что способствует (вероятно, вместе с другими сигнальными каскадами) активации факторов транскрипции, приводящей

к экспрессии или репрессии генов, вовлеченных в регуляцию фенотипа мышечных клеток. Отмечено, что IP3-опосредованный кальциевый сигнал вызывал активацию ряда транскрипционных факторов и генов [17, 28]. Гипотеза о роли кальций-зависимой регуляции экспрессии генов при разгрузке скелетных мышц была выдвинута Kandarian и Stevenson в 2002 г. [29].

Мы полагаем, что накопление ионов кальция и IP3 в миоплазме при функциональной разгрузке может вызвать активацию IP3R, что может способствовать (возможно, совместно с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов и стимулировать запуск атрофических процессов при разгрузке мышц. К настоящему времени не было изучено, какую роль играют IP3R при функциональной разгрузке мышц в контроле атрофических процессов. Мы впервые проверяли эту гипотезу в нашем исследовании, применив ингибирование IP3R при функциональной разгрузке *m. soleus* в модели вывешивания задних конечностей крыс в течение 7 суток, т.к. известно, что после 7 суток вывешивания происходит достоверное снижение размеров волокон камбаловидной мышцы и трансформация миозинового фенотипа волокон из «медленного» в «быстрый». Если наша гипотеза верна, то ингибирование IP3R при функциональной разгрузке должно снизить развитие протеолитических процессов и предотвратить усиление распада белка в мышце.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение эксперимента

Функциональная разгрузка моделировалась вывешиванием задних конечностей по стандартной методике Ильина – Новикова в модификации Morey-Holton [1]. Вывешивание проводилось под углом 45 градусов к полу клетки так, что задние конечности крыс не касались пола, а передние свободно опирались на пол, и животные свободно передвигались. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. 32 самца крыс линии Wistar были распределены на 4 группы – виварный контроль с введением плацебо (7C, *n* = 8), виварный контроль с введением препарата 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate) (7CA, *n* = 8), группа вывешивания с введением плацебо (7HS, *n* = 8) и группа вывешивания с введением препарата 2-APB (7HSA, *n* = 8). Препарат вводился внутривентрально в дозе 10 мг/кг в 5%-ном растворе ДМСО ежедневно. Применение этого ингибитора *in vivo* было описано ранее [30]. 2-APB, широко применяемый в качестве ингибитора IP3R препарат [31], ингибирует IP3-зависимые сигналы [19]. Известные для него неспецифические эффекты вызывались большими концентрациями в разы, а в некоторых случаях на порядки [32], чем используемая нами для ингибирования IP3R доза препарата.

Через 7 дней эксперимента крыс наркотизировали авертином (5 мл/кг массы тела 10%-ного раствора), выделяли *m. soleus* и немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при –85 °C до проведения анализов. Эвтаназия крыс осуществлялась дислокацией шейных позвонков под авертиновым наркозом.

Электрофорез и Вестерн-блоттинг

Для выделения тотальной фракции белка с образцов *m. soleus* на микротоме-криостате фирмы Leica были сделаны срезы толщиной 20 мкм (общей массой 15–20 мг на 1 пробу) и немедленно прогомогенизированы в шариковом гомогенизаторе TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) в течение 25 мин в 100 мкл лизирующего буфера RIPA (Santa-Cruz, США), содержащего 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, аprotинин (10 мкг/мл), леупептин (10 мкг/мл), пепстатин А (10 мкг/мл), протеазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, США) и фосфатазный ингиби-

торный коктейль (Santa-Cruz, США). Затем образцы центрифугировали при 20000 g в течение 15 мин. Супернатант отбирали, разаликвотировали и убирали на хранение при -85°C .

Часть мышечных лизатов отбирали для определения концентрации общего белка с помощью реактива Бредфорда (Bio-Rad Laboratories, США). Определения проводились на планшетном фотометре Epoch при длине волны 595 нм. Пробы для нанесения разводились в 2-кратном Laemli-буфере для образцов (5.4 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 %-ный Ds-Na, 20 %-ный глицерин, 10 %-ный β -меркаптоэтанол, 0.02 %-ный бром-феноловый синий). Заливку и подготовку ПААГ гелей проводили с помощью заливочных столов фирмы и стекол «Bio-Rad Laboratories». Гели устанавливали в камеры mini-Protean 3 Cell «Bio-Rad Laboratories». Электрофорез проводили в 10 %-ном разделяющем ПААГ (0.2 %-ный метилбисакриламид, 0.1 %-ный Ds-Na, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.05 %-ный персульфат аммония, 0.1 %-ный ТЕМЕД) и в 5 %-ном концентрирующем ПААГ (0.2 %-ный метилбисакриламид, 0.1 %-ный Ds-Na, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.5 %-ный аммоний персульфат, 0.1 %-ный ТЕМЕД). Для проведения электрофореза был использован трис-глициновый буфер (192 mM Tris-глицин (pH 8.6), 0.1 %-ный Ds-Na). Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами и маркерами молекулярных весов. Образцы загружались из расчета 20 мкг общего белка на дорожку. Уровень фосфорилирования белков определяли, нормируя содержание фосфорилированной формы белка на содержание тотальной формы этого же белка в образце. Электрофорез проводился при 15 мА на гель в мини-системе («Bio-Rad Laboratories») при комнатной температуре. После электрофореза гели переносились в установку для электропереноса белков на мембрану. Электроперенос проводился в буфере (25 mM Tris (pH 8.3), 192 mM глицин, 20 %-ный этанол, 0.04 %-ный Ds-Na) на нитроцеллюлозную мембрану при 100 V при температуре 4°C в системе mini Trans-Blot («Bio-Rad Laboratories») в течение 2 ч. После электропереноса мембраны инкубировались в течение 5 мин в 0.3 %-ном растворе Ponceau Red в 5 %-ной уксусной кислоте, затем отмывались в PBS (Биолот) с 0.1 %-ным Tween 20 (PBST) до появления четких белковых полос на мембране. Этот этап проводился для контроля эффективности переноса; а также для того, чтобы убедиться, что количество общего белка, внесенного в каждую дорожку, было одинаковым. Мембраны блокировались в растворе 5 %-ного сухого молока («Bio-Rad Laboratories») в PBST в течение 1 ч при комнатной температуре, затем помещались в раствор первичных антител на ночь при 4°C . Для выявления белковых полос были использованы первичные антитела против p-CaMKII β (1: 1000, #12716), CaMKII (1: 1000, #3362) фирмы «Cell Signaling Technology». На следующий день мембрана отмывалась от первичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере и инкубировалась 1 ч со вторичными антителами goat-anti-rabbit (1: 30000, «Jackson Immuno Research», США). Потом мембрана отмывалась от вторичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере. Выявление проводилось с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, США). Хемилюминесцентный сигнал детектировался с помощью сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Мембраны, на которых детектировали данные белки, после детекции содержания фосфорилированной формы белка отмывали в восстанавливающем растворе Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific), после чего анализировали содержание тотальной формы на этих же мембранах путем инкубирования с первичными антителами к тотальным формам белков в течение ночи при 4°C . Затем мембраны отмывали и инкубировали со вторичными антителами и проявляли, как описано выше. Для каждого параметра электрофорез с последующим иммуноблоттингом был повторен не менее 3 раз. Белковые полосы были анализированы с использованием Image Studio Software (LI-COR). Хемилюминесцентный сигнал полосы контрольной группы на анализируемой

мембране принимали за 100 %, а сигнал полос других групп сравнивали с сигналом полос контрольной группы, расположенных на одной и той же мембране.

ПЦР в реальном времени

Для исследования экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени проводили выделение РНК из образцов мышечной ткани. Для выделения РНК из скелетных мышц была использована методика выделения РНК на микроколонках «RNeasy Micro» («Qiagen», Германия) согласно рекомендациям производителя. Определение концентрации мРНК осуществлялось по поглощению раствора мРНК при помощи спектрофотометра NanoPhotometer IMPLN. Измерение каждой пробы проводилось не менее 3 раз. Для проведения обратной транскрипции были использованы реагенты фирмы «Синтол» (Россия) согласно рекомендациям производителя. Праймеры сконструированы с помощью программы Primer3 v.0.4.0, находящейся в свободном доступе (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). В работе были использованы следующие праймеры: 5'-gccaatgtgtgcttttgt-3' и 5'-aaattcagtcctctcccggt-3' для MuRF-1; 5'-ctacgatgtgcagccaaga-3' и 5'-ggcagtcgagaagtcagtc-3' для MAFbx; 5'-caccagaaggtcaaacagga-3' и 5'-gcaagaacttattcaag-tgcaa-3' для убиквитина; 5'-ccggagaggagacttcacag-3' и 5'-acagtgcacatcgctgttc-3' для IL6, 5'-cat-gac-ctc-cct-tgc-atg-taa-c-3' и 5'-acc-agg-tgg-tgg-gta-agg-aac-3' для ULK1, 5'-cag-gaa-cgt-ggg-cca-taa-ca-3' и 5'-tcc-aga-gct-tca-tcg-cca-tc-3' для IP3R, 5'-gta-ccc-ttc-ctc-ttc-cct-atg-c-3' и 5'-caa-tgc-saa-ctc-tcg-tca-aca-g-3' для RPL19. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор для проведения ПЦР в реальном времени с добавлением SYBR Green фирмы «Синтол» (Россия) согласно рекомендациям производителя.

Электрофорез РНК

Для проведения электрофореза РНК, выделенную как описано ранее, смешивали с равным объемом денатурирующего буфера для нанесения (Thermo Scientific, США) и нагревали 10 мин при 70 °С согласно рекомендациям производителя. Для электрофореза использовали 1.2%-ный агарозный гель с использованием бромистого этидия (0.5 мкг/мл), приготовленный на буфере TBE (89 мМ ТРИС, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, рН 8.0). Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см длины геля в буфере TBE. Для определения длин полос РНК использовали маркеры RiboRuler (Thermo Scientific, США). Результаты электрофореза визуализировали на Gel Doc EZ Imager (Biorad, США). Для обчета результатов использовали программное обеспечение Image Studio Digits v. 4.0. Степень деградации РНК определяли по вычислению соотношения 28S РНК к 18S РНК.

Иммуногистохимический анализ

С помощью криомикротомы изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили при -20 °С. Перед окрашиванием срезы оттаивали и регидратировали при комнатной температуре в фосфатно-буферном растворе (PBS) в течение 20 мин, а затем инкубировали с антителами против тяжелых цепей миозина быстрого или медленного типов (МНСI и МНСII, Sigma, США) 1: 400 в PBS во влажной камере при 37 °С в течение часа (или при 4 °С на ночь). Затем антитела отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor (1: 500) в PBS, проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа LeicaQ500MC с встроенной цифровой фотокамерой (TCM 300F, Leica, Германия), с увеличением x200. Анализ изображений

проводился с помощью программы Image J. Измеряли площадь поперечного сечения по крайней мере 100 волокон.

Статистическая обработка данных

Для анализа данных полученных с помощью ПЦР в реальном времени, применялось относительное количественное определение исследуемого гена, нормализованное к референсному, метод 2- $\Delta\Delta C_t$ (метод Ливака). В качестве референсного гена был использован RPL19, экспрессия которого постоянна в *m. soleus* в условиях эксперимента. Статистическая обработка данных производилась с помощью программы REST 2009 v.2.0.12, пакета SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., 2008). Достоверность отличий между группами определялась с помощью критерия Краскела – Уоллиса. В тексте и на гистограммах результаты ПЦР представлены в виде медианы и интерквартильной широты. Количество (*n*) в выборках равно 8. Статистически достоверными различия считали при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы не обнаружили различий в массе *m. soleus* и индексе сырой массы *m. soleus* между вывешенными HS и HSA группами (они были ниже, чем у контрольных групп C и CA), рис. 1.

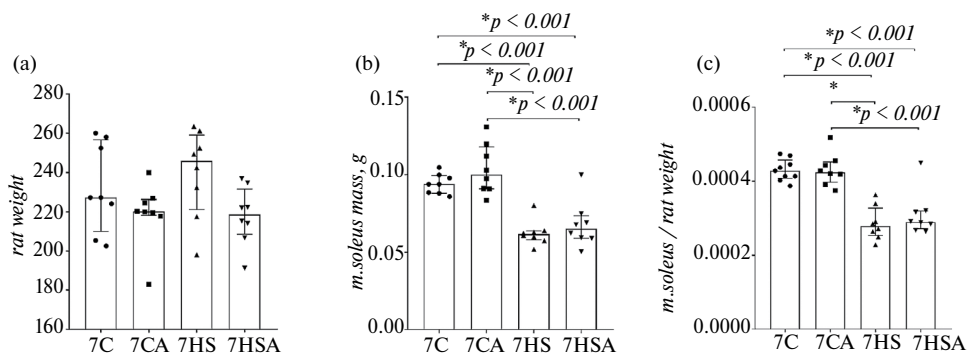


Рис. 1. Масса тела животных (а), масса *m. soleus* (б) и индекс сырой массы *m. soleus* (с). 7C – виварный контроль с введением плацебо, 7CA – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ. * – значимые отличия между группами ($p < 0.001$).

В то же время мы обнаружили, что площадь поперечного сечения как медленных, так и быстрых мышечных волокон *m. soleus* в группе 7-суточного вывешивания (7HS) была достоверно ниже значений групп контроля (7C и 7CA) ($p < 0.05$), рис. 2. Введение ингибитора IP3R при вывешивании (7HSA) предотвратило снижение площади поперечного сечения медленных и быстрых мышечных волокон (их значения не отличались от групп контроля и были достоверно выше, чем в группе 7HS ($p < 0.001$)).

Мы обнаружили существенное снижение содержания маркеров рибосомального биогенеза рРНК 18S (малая субъединица рибосомы) и рРНК 28S (большая субъединица рибосомы) только у вывешенных без введения ингибитора IP3R животных (группа 7HS, рис. 3) относительно контрольных групп.

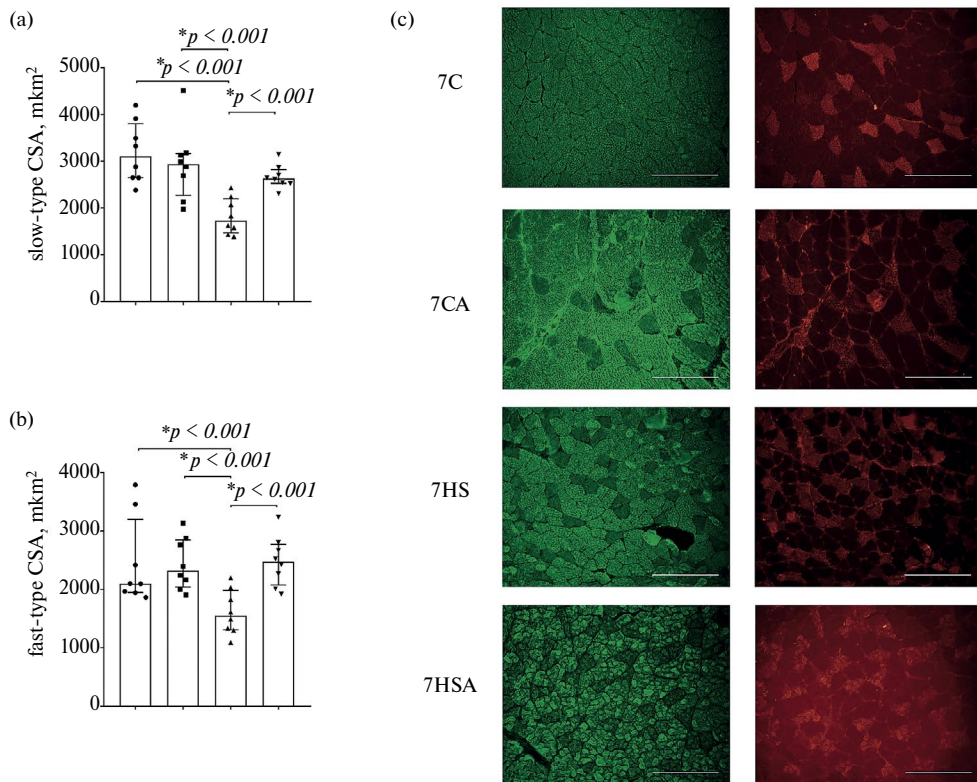


Рис. 2. Площадь поперечного сечения медленных волокон (а), быстрых волокон (б) и микрофотографии иммуногистохимической окраски медленного миозина (зеленые) и быстрого миозина (красные) (с). 7С – виварный контроль с введением плацебо, 7СА – виварный контроль с введением 2-АПВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АПВ. * – значимые отличия между группами. Размерная полоса равна 200 мкм.

Экспрессия маркеров убиквитин-протеасомной системы E3 лигаз MuRF1 и MAFbx/Atrogin-1, а также убиквитина была существенно повышена в обеих вывешенных группах крыс (относительно групп контроля), рис. 4. Введение ингибитора IP3R не выявило отличий по сравнению с группой вывешивания без препарата 7HS.

Уровень экспрессии мРНК маркера аутофагии ULK1 (серин-пролиновая киназа, участвующая в аутофагии) был повышен только в группе вывешивания без препарата (7HS), но не в группе с введением ингибитора IP3R (7HSA) относительно групп контроля, рис. 5а. Аналогичные результаты были получены и для экспрессии мРНК интерлейкина 6 (IL6) и рецепторов IL6 (IL6R). Мы обнаружили предотвращение увеличения экспрессии мРНК IL6 (рис. 5б) в группе 7HSA при введении ингибитора IP3R во время вывешивания крыс относительно группы 7С.

Содержание маркеров кальций-зависимых сигнальных путей IP3R и p-CaMK при 7-дневном вывешивании крыс. Фосфорилирование кальций-кальмодулинкиназы IIb (CaMKIIb) было увеличено в ненагруженной камбаловидной мышце (гр. HS) относительно группы контроля, рис. 6. Введение ингибитора IP3R предотвратило эти изменения. Аналогичные результаты получены для содержания мРНК IP3R, рис. 7.

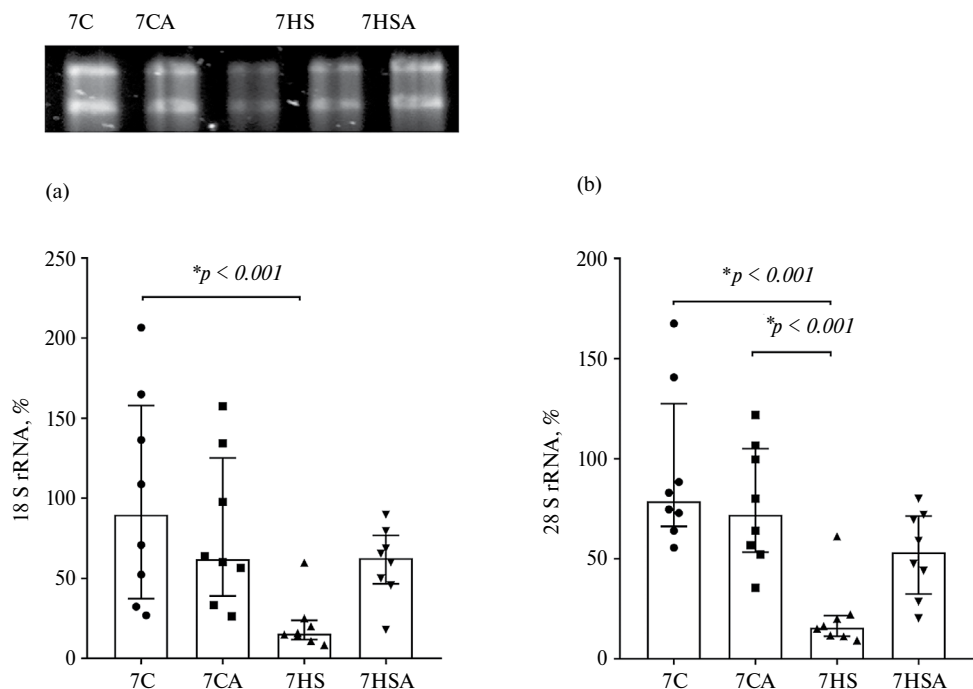


Рис. 3. Содержание 18S рРНК (а), 28S рРНК (б) в *m. soleus* при введении 2-АРВ на фоне 7-суточного вывешивания. 7C – виварный контроль с введением плацебо, 7CA – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ, * – значимые отличия между группами.

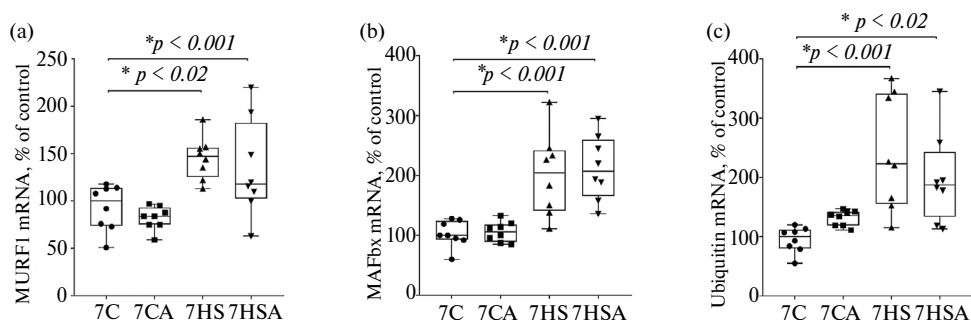


Рис. 4. Экспрессия мРНК MuRF1 (а), MAFbx (б), убиквитина (с) в *m. soleus* при введении 2-АРВ на фоне 7-суточного вывешивания. 7C – виварный контроль с введением плацебо, 7CA – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ. * – значимые отличия между группами.

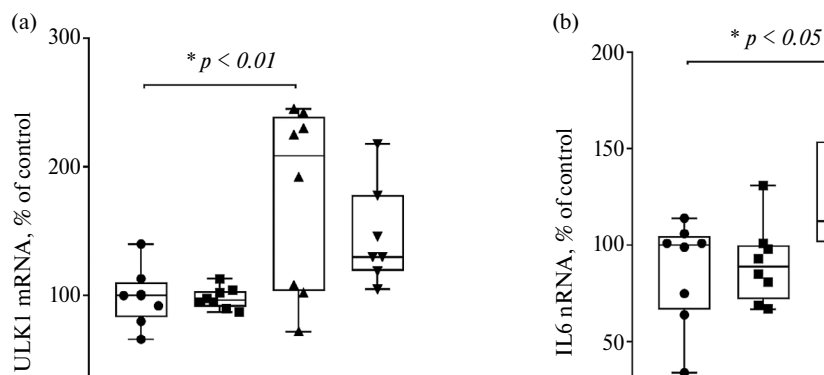


Рис. 5. Экспрессия мРНК ULK1 (a) и IL6 (b) в *m. soleus* при введении 2-APB на фоне 7-суточного вывешивания. 7C – виварный контроль с введением плацебо, 7CA – виварный контроль с введением 2-APB, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-APB. * – значимые отличия между группами.

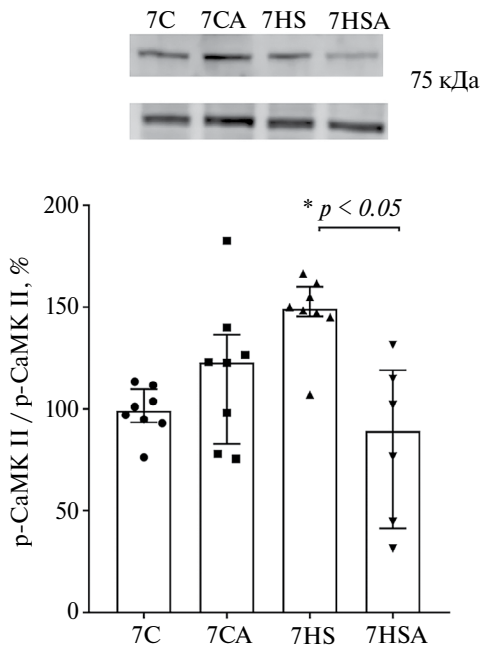


Рис. 6. Уровень фосфорилирования CaMKIIb в *m. soleus* при введении 2-APB на фоне 7-суточного вывешивания. 7C – виварный контроль с введением плацебо, 7CA – виварный контроль с введением 2-APB, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-APB. * – значимые отличия между группами.

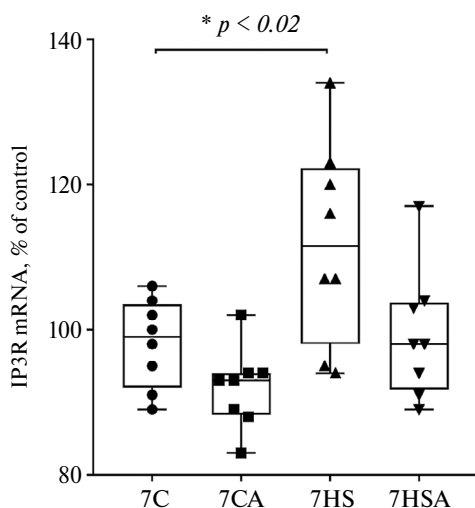


Рис. 7. Экспрессия мРНК IP3R в *m. soleus* при введении 2-АРВ на фоне 7-суточного вывешивания. 7C – виварный контроль с введением плацебо, 7CA – виварный контроль с введением 2-АРВ, 7HS – 7-суточное вывешивание с введением плацебо, 7HSA – 7-суточное вывешивание с введением 2-АРВ. * – значимые отличия между группами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Введение блокатора IP3R2-АРВ вывешенным животным успешно предотвращало снижение площади поперечного сечения как быстрых, так и медленных волокон камбаловидной мышцы. В то же время возникает вопрос, по каким причинам предотвращение атрофии волокон камбаловидной мышцы не отражается на изменении массы мышц экспериментальных животных (рис. 1). Расхождение данных по площади поперечного сечения волокон и массы мышц может быть связано с неволоконными компонентами мышц, такими как внеклеточный матрикс и жидкость (вода, кровь, лимфа). В частности, известно, что в условиях вывешивания снижается мышечный кровоток и, соответственно, кровенаполнение камбаловидной мышцы [33], что могло повлиять на массу мышц. Причины снижения степени атрофии *m. soleus* при функциональной разгрузке могут быть в следующем: гипокинезия приводит к атрофии скелетных мышц из-за нарушения баланса между синтезом белка и его деградацией [34].

Маркеры анаболического сигналинга. рРНК осуществляют трансляцию – считывание информации с мРНК и катализ образования пептидных связей между присоединенными к тРНК аминокислотами. В группе 7HSA (с введением ингибитора IP3R) существенных отличий от групп контроля по этим параметрам не наблюдалось. Таким образом, введение 2-АРВ вывешенным животным (7HSA) приводит к предотвращению снижения содержания рибосомальных РНК 18S и 28S. Можно предположить, что предотвращение снижения площади поперечного сечения медленных и быстрых мышечных волокон *m. soleus* животных, вывешенных 7 суток с ингибированием IP3R, могло быть связано с улучшениями в работе рибосом.

Механизм, за счет которого введение 2-АРВ регулирует содержание 18S и 28S рибосомальных РНК, может быть связан с 2-АРВ-зависимой регуляцией уровня миоплазматиче-

ского и, возможно, ядерного кальция. Ранее было показано, что активность рибосомальных генов, с которых происходит транскрипция рРНК, регулируется метилированием CpG-островков [35, 36]. Рост CpG-метилирования ведет к блокированию экспрессии генов; данному процессу противодействуют транслоказы, деметилирующие CpG [37]. Транслоказы TET могут подвергаться протеолизу со стороны кальций-зависимых протеаз кальпаинов [38]. Таким образом, накопление кальция может приводить к активации кальпаинов, деградации TET и росту метилирования CpG-островков на промоторах рибосомальных генов: введение 2-APB может противодействовать данному процессу, предотвращая накопление кальция, активацию кальпаинов и деградацию транслоказ TET.

Маркеры белковой деградации. Для исследования сигналинга деградации белка мы определили содержание маркеров убиквитин-протеасомной системы: E3-убиквитинлигазы MuRF1 и MAFbx/Atrogin-1, а также убиквитина. Их экспрессия была существенно повышена в обеих вывешенных группах крыс (относительно групп контроля). Увеличение экспрессии этих маркеров при функциональной разгрузке показано ранее [39]. Итак, мы не обнаружили взаимосвязи между частичным снижением атрофии *m. soleus* в группе 7HSA крыс и содержанием маркеров убиквитин-протеасомной системы.

Однако кроме убиквитин-протеасомной системы, деградацию белка контролирует лизосомально-протеасомная система, поэтому мы определили экспрессию маркера ULK1. В группе вывешенных крыс ее уровень был повышен, что согласуется с предыдущими исследованиями [9, 40]. Ингибирование IP3R на фоне вывешивания привело к частичному предотвращению роста экспрессии мРНК ULK1. Наши результаты согласуются с ранними исследованиями, где обнаружено, что активность IP3R1 в мышцах mdx мышей повышала уровень аутофагии, тогда как нокаут IP3R1 возвращал его к базальному уровню [24]. IP3R могут как стимулировать, так и ингибировать аутофагию [41] посредством нескольких механизмов, таких как изменение цитозольного и/или митохондриального уровня Ca^{2+} [42]. В работе [24] описано влияние уровня кальция и АТФ на экспрессию ULK-1, в регуляции которых участвуют IP3R. При разгрузке мышц уровень кальция и АТФ в цитоплазме также повышен, что могло быть стимулом повышения ULK-1.

Аналогичные результаты были получены и для экспрессии мРНК IL6 на 7-е сутки вывешивания при введении 2-APB. Известно, что содержание миокина IL-6 увеличивается при функциональной разгрузке мышц [27, 43, 44]. IL-6 способен влиять на генную экспрессию через эпигеномную модификацию [45–47]. Блокирование рецепторов IL-6 предотвращает развитие атрофии *m. soleus* [43], а введение IL-6 в мышцу, напротив, ведет к ее атрофии [48]. Ранее показано, что IP3-опосредованный кальциевый сигнал индуцирует активацию гена IL-6 [17, 28]. Повышенный уровень IP3 в *m. soleus* вывешенных крыс обнаружен ранее [4]. При блокировании DHPR во время вывешивания уровень IL-6 в *m. soleus* крыс снижался [44], что свидетельствует о кальций-зависимых процессах, регулирующих его экспрессию. IP3R регулируют гомеостаз в том числе внутриядерного кальция [30], за счет чего они способны регулировать экспрессию генов.

Можно заключить, что к частичному предотвращению снижения площади поперечного сечения волокон камбаловидной мышцы при введении ингибитора IP3R на фоне 7-дневного вывешивания крыс могло привести предотвращение повышения уровня экспрессии мРНК IL6 и мРНК маркера аутофагии ULK1. Мы не обнаружили влияния маркеров убиквитин-протеасомной системы на регуляцию этого процесса.

Содержание кальций-зависимых маркеров при 7-суточном вывешивании крыс. Мы определили уровень фосфорилирования по Thr-286 кальций-зависимого маркера CaMKII β (кальций-кальмодулинкиназы) в тотальной белковой фракции. Внутриклеточный кальций является одним из регуляторов активности CaMKII β [49, 50]; аминокислотный остаток Thr-286 молекулы CaMKII β фосфорилируется при повышении содержания ионов кальция [46, 47]. Фосфорилирование CaMKII β было увеличено в ненагруженной камбаловидной мышце (группа HS) относительно группы контроля (рис. 6), однако введение ингибитора IP3R предотвратило эти изменения. Эти результаты

хорошо согласуются с ранее обнаруженным накоплением ионов кальция в миоплазме на фоне вывешивания [2], а также свидетельствуют в пользу того, что применение ингибитора IP3R2-АРВ на фоне вывешивания может быть связано со снижением кальциевого сигнала в мышечных волокнах.

Также в работе было обнаружено повышенное содержание мРНК IP3R в ненагруженной камбаловидной мышце по сравнению с контрольной группой. Увеличенный уровень IP3R был обнаружен ранее в *m. soleus* вывешенных крыс [4]. Такого повышения не наблюдалось в группе с введением 2-АРВ. Хотя 2-АРВ ингибирует IP3R за счет связывания с их активным центром, в литературе есть данные о снижении экспрессии IP3R в тканях при введении 2-АРВ [51], что согласуется с результатами наших исследований.

IP3R находятся в мембране саркоплазматического ретикулула, ядра, а также митохондрий, активируются IP3 и Ca^{2+} [10, 11, 52], а также регулируют гомеостаз кальция в клетке [53]. СаМКП – кальций-зависимая киназа [54]. Наблюдаемое снижение экспрессии IP3R в группе 7HSA, наряду с ингибирующим действием 2-АРВ на активные центры рецепторов, могло внести вклад в снижение кальций-зависимого фосфорилирования СаМКП в данной экспериментальной группе.

Можно заключить, что к снижению степени атрофии *m. soleus* при введении ингибитора IP3R на фоне 7-дневного вывешивания крыс могло привести предотвращение снижения рибосомального биогенеза, а также предотвращение повышения уровня экспрессии маркера аутофагии ULK1 и IL6. Мы не обнаружили включения маркеров убиквитин-протеасомной системы в регуляцию этого процесса. Эффекты введения ингибитора IP3R2 – АРВ могут быть связаны с IP3-зависимой регуляцией внутриклеточного кальция.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Н. Т. Л., сбор данных – З. К. А., Б. Р. О., Ш. К. А., обработка данных – З. К. А., Б. Р. О., Ш. К. А., Б. С. П., написание и редактирование манускрипта – Н. Т. Л., Б. С. П.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета РФ в рамках научного проекта № 24–15–00088. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 627 от 6 декабря 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morey-Holton E, Globus RK, Kaplansky A, Durnova G (2005) The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv Space Biol Med* 10: 7–40.
[https://doi.org/10.1016/s1569-2574\(05\)10002-1](https://doi.org/10.1016/s1569-2574(05)10002-1)
2. Ingalls CP, Warren GL, Armstrong RB (1999) Intracellular Ca^{2+} transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J Appl Physiol* (1985) 87(1): 386–390.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.1.386>

3. *Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2008) Calcium-dependent signaling mechanisms and soleus fiber remodeling under gravitational unloading. *J Muscle Res Cell Motil* 29(6–8): 221–230.
<https://doi.org/10.1007/s10974-008-9164-7>
4. *Yang H, Wang H, Pan F, Guo Y, Cao L, Yan W, Gao Y* (2023) New Findings: Hindlimb Unloading Causes Nucleocytoplasmic Ca^{2+} Overload and DNA Damage in Skeletal Muscle. *Cells* 12(7):
<https://doi.org/10.3390/cells12071077>
5. *Melnikov IY, Tyganov SA, Sharlo KA, Ulanova AD, Vikhlyantsev IM, Mirzoev TM, Shenkman BS* (2022) Calpain-dependent degradation of cytoskeletal proteins as a key mechanism for a reduction in intrinsic passive stiffness of unloaded rat postural muscle. *Pflugers Arch* 474(11): 1171–1183.
<https://doi.org/10.1007/s00424-022-02740-5>
6. *Mijares A, Allen PD, Lopez JR* (2020) Senescence Is Associated With Elevated Intracellular Resting $[\text{Ca}^{2+}]$ in Mice Skeletal Muscle Fibers. An in vivo Study. *Front Physiol* 11: 601189.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.601189>
7. *Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA* (1988) Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 335(6192): 735–738.
<https://doi.org/10.1038/335735a0>
8. *Carafoli E, Krebs J* (2016) Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem* 291(40): 20849–20857.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R116.735894>
9. *Chibalin AV, Benziane B, Zakyryanova GF, Kravtsova VV, Krivoi II* (2018) Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension. *J Cell Physiol* 233(10): 6329–6336.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26594>
10. *Georgiev T, Svirin M, Jaimovich E, Fink RH* (2015) Localized nuclear and perinuclear Ca^{2+} signals in intact mouse skeletal muscle fibers. *Front Physiol* 6: 263.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00263>
11. *Taylor CW, Tovey SC* (2010) IP(3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12): a004010.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004010>
12. *Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO* (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol Rev* 87(2): 593–658.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2006>
13. *Berridge MJ* (2016) The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev* 96(4): 1261–1296.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2016>
14. *Midrio M, Danieli-Betto D, Megighian A, Betto R* (1997) Early effects of denervation on sarcoplasmic reticulum properties of slow-twitch rat muscle fibres. *Pflugers Arch* 434(4): 398–405.
<https://doi.org/10.1007/s004240050413>
15. *Sharlo KA, Lvova ID, Tyganov SA, Zaripova KA, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2023) The Effect of SERCA Activation on Functional Characteristics and Signaling of Rat Soleus Muscle upon 7 Days of Unloading. *Biomolecules* 13(9):
<https://doi.org/10.3390/biom13091354>
16. *Jaimovich E, Reyes R, Liberona JL, Powell JA* (2000) IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca^{2+} signals in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(5): C998–C1010.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.5.C998>
17. *Arias-Calderon M, Almaraz G, Diaz-Vegas A, Contreras-Ferrat A, Valladares D, Casas M, Toledo H, Jaimovich E, Buvinic S* (2016) Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle. *Skelet Muscle* 6: 15.
<https://doi.org/10.1186/s13395-016-0087-5>
18. *Casas M, Altamirano F, Jaimovich E* (2012) Measurement of calcium release due to inositol trisphosphate receptors in skeletal muscle. *Methods Mol Biol* 798: 383–393.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-343-1_22
19. *Cardenas C, Liberona JL, Molgo J, Colasante C, Mignery GA, Jaimovich E* (2005) Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca^{2+} transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *J Cell Sci* 118(Pt 14): 3131–3140.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02446>
20. *Araya R, Liberona JL, Cardenas JC, Riveros N, Estrada M, Powell JA, Carrasco MA, Jaimovich E* (2003) Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *J Gen Physiol* 121(1): 3–16.
<https://doi.org/10.1085/jgp.20028671>

21. Powell JA, Carrasco MA, Adams DS, Drouet B, Rios J, Muller M, Estrada M, Jaimovich E (2001) IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3673–3683.
<https://doi.org/10.1242/jcs.114.20.3673>
22. Altamirano F, Valladares D, Henriquez-Olguin C, Casas M, Lopez JR, Allen PD, Jaimovich E (2013) Nifedipine treatment reduces resting calcium concentration, oxidative and apoptotic gene expression, and improves muscle function in dystrophic mdx mice. *PLoS One* 8(12): e81222.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081222>
23. Casas M, Buvinic S, Jaimovich E (2014) ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exerc Sport Sci Rev* 42(3): 110–116.
<https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000017>
24. Valladares D, Utreras-Mendoza Y, Campos C, Morales C, Diaz-Vegas A, Contreras-Ferrat A, Westermeier F, Jaimovich E, Marchi S, Pinton P, Lavandero S (2018) IP(3) receptor blockade restores autophagy and mitochondrial function in skeletal muscle fibers of dystrophic mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(11): 3685–3695.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.042>
25. Kravtsova VV, Paramonova II, Vilchinskaya NA, Tishkova MV, Matchkov VV, Shenkman BS, Krivoi II (2021) Chronic Ouabain Prevents Na, K-ATPase Dysfunction and Targets AMPK and IL-6 in Disused Rat Soleus Muscle. *Int J Mol Sci* 22(8):
<https://doi.org/10.3390/ijms22083920>
26. Zaripova KA, Kalashnikov EP, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2021) Role of Pannexin 1 ATP-Permeable Channels in the Regulation of Signaling Pathways during Skeletal Muscle Unloading. *Int J Mol Sci* 22(19):
<https://doi.org/10.3390/ijms221910444>
27. Zaripova KA, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2024) P2Y1 and P2Y2 receptors differ in their role in the regulation of signaling pathways during unloading-induced rat soleus muscle atrophy. *Arch Biochem Biophys* 751: 109844.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109844>
28. Carrasco MA, Riveros N, Rios J, Muller M, Torres F, Pineda J, Lantadilla S, Jaimovich E (2003) Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(6): C1438–C1447.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00117.2002>
29. Kandarian SC, Stevenson EJ (2002) Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exerc Sport Sci Rev* 30(3): 111–116.
<https://doi.org/10.1097/00003677-200207000-00004>
30. Ye L, Zeng Q, Ling M, Ma R, Chen H, Lin F, Li Z, Pan L (2021) Inhibition of IP3R/Ca²⁺ Dysregulation Protects Mice From Ventilator-Induced Lung Injury via Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Pathways. *Front Immunol* 12: 729094.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.729094>
31. Gambardella J, Morelli MB, Wang X, Castellanos V, Mone P, Santulli G (2021) The discovery and development of IP3 receptor modulators: an update. *Expert Opin Drug Discov* 16(6): 709–718.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1858792>
32. Bilmen JG, Wootton LL, Godfrey RE, Smart OS, Michelangeli F (2002) Inhibition of SERCA Ca²⁺ pumps by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). 2-APB reduces both Ca²⁺ binding and phosphoryl transfer from ATP, by interfering with the pathway leading to the Ca²⁺-binding sites. *Eur J Biochem* 269(15): 3678–3687.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03060.x>
33. Kimura S, Inaoka PT, Yamazaki T (2012) Influence of passive stretching on inhibition of disuse atrophy and hemodynamics of rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc* 15(1): 9–14.
https://doi.org/10.1298/jjpta.Vol15_002
34. Baldwin KM, Haddad F (2002) Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81(11 Suppl): S40–S51.
<https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000029723.36419.0D>
35. D'Aquila P, Montesanto A, Mandala M, Garasto S, Mari V, Corsonello A, Bellizzi D, Passarino G (2017) Methylation of the ribosomal RNA gene promoter is associated with aging and age-related decline. *Aging Cell* 16(5): 966–975.
<https://doi.org/10.1111/acel.12603>
36. Grummt I, Langst G (2013) Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1829(3–4): 393–404.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.10.004>
37. Williams K, Christensen J, Helin K (2011) DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep* 13(1): 28–35.
<https://doi.org/10.1038/embor.2011.233>

38. Wang Y, Zhang Y (2014) Regulation of TET protein stability by calpains. *Cell Rep* 6(2): 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.031>
39. Bodine SC, Baehr LM (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307(6): E469–E484. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
40. Belova SP, Zaripova K, Sharlo K, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2022) Metformin attenuates an increase of calcium-dependent and ubiquitin-proteasome markers in unloaded muscle. *J Appl Physiol* (1985) <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00415.2022>
41. Parys JB, Decuypere JP, Bultynck G (2012) Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺-release channel in autophagy. *Cell Commun Signal* 10(1): 17. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-17>
42. Criollo A, Vicencio JM, Tasdemir E, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G (2007) The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy* 3(4): 350–353. <https://doi.org/10.4161/auto.4077>
43. Yakabe M, Ogawa S, Ota H, Iijima K, Eto M, Ouchi Y, Akishita M (2018) Inhibition of interleukin-6 decreases atrogenic expression and ameliorates tail suspension-induced skeletal muscle atrophy. *PLoS One* 13(1): e0191318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191318>
44. Вильчинская НА, Парамонова ИИ, Немировская ТЛ, Ломоносова ЮН, Шенкман БС (ред) (2020) Экспрессия интерлейкина-6 в камбаловидной мышце крысы в условиях функциональной разгрузки. Динамика процесса и роль кальциевых каналов L-типа. *Авиакосм экол мед* 54(3): 70–78. [Vil'chinskaya NA, Paramonova II, Nemirovskaya TL, Lomonosova YN, Shenkman BS (2020) Expression of interleukin-6 in the rat soleus muscle under conditions of functional unloading. Dynamics of the process and the role of L-type calcium channels. *Aviakosm ecol med* 54(3): 70–78. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2020-54-3-70-78>
45. Hodge DR, Cho E, Copeland TD, Guszczynski T, Yang E, Seth AK, Farrar WL (2007) IL-6 enhances the nuclear translocation of DNA cytosine-5-methyltransferase 1 (DNMT1) via phosphorylation of the nuclear localization sequence by the AKT kinase. *Cancer Genomics Proteomics* 4(6): 387–398. <https://doi.org/>
46. Rose AJ, Kiens B, Richter EA (2006) Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol* 574(Pt 3): 889–903. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.111757>
47. Rostas JAP, Skelding KA (2023) Calcium/Calmodulin-Stimulated Protein Kinase II (CaMKII): Different Functional Outcomes from Activation, Depending on the Cellular Microenvironment. *Cells* 12(3): <https://doi.org/10.3390/cells12030401>
48. Sun H, Sun J, Li M, Qian L, Zhang L, Huang Z, Shen Y, Law BY, Liu L, Gu X (2021) Transcriptome Analysis of Immune Receptor Activation and Energy Metabolism Reduction as the Underlying Mechanisms in Interleukin-6-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Front Immunol* 12: 730070. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730070>
49. Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ (2008) AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65(23): 3737–3755. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8244-6>
50. Raney MA, Turcotte LP (2008) Evidence for the involvement of CaMKII and AMPK in Ca²⁺-dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle. *J Appl Physiol* (1985) 104(5): 1366–1373. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01282.2007>
51. Liang Q, Zhang Y, Zeng M, Guan L, Xiao Y, Xiao F (2018) The role of IP3R-SOCs in Cr(vi)-induced cytosolic Ca(2+) overload and apoptosis in L-02 hepatocytes. *Toxicol Res (Camb)* 7(3): 521–528. <https://doi.org/10.1039/c8tx00029h>
52. Hohendanner F, Maxwell JT, Blatter LA (2015) Cytosolic and nuclear calcium signaling in atrial myocytes: IP3-mediated calcium release and the role of mitochondria. *Channels (Austin)* 9(3): 129–138. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1040966>
53. Gomes DA, Leite MF, Bennett AM, Nathanson MH (2006) Calcium signaling in the nucleus. *Can J Physiol Pharmacol* 84(3–4): 325–332. <https://doi.org/10.1139/y05-117>
54. Park S, Scheffler TL, Gerrard DE (2011) Chronic high cytosolic calcium decreases AICAR-induced AMPK activity via calcium/calmodulin activated protein kinase II signaling cascade. *Cell Calcium* 50(1): 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.009>

2-Apb Prevents Atrophic Changes and alters Cellular Signalling During Unloading of Rat *M. Soleus*

K. A. Zaripova^a, R. O. Bokov^a, K. A. Sharlo^a, S. P. Belova^a, and T. L. Nemirovskaya^a

^a*Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: Nemirovskaya@bk.ru*

IP3 receptors are found in significant quantities in muscle fibers in the sarcoplasmic reticulum, nucleus and mitochondria. We hypothesized that activation of IP3 receptors (IP3Rs) during muscle unloading may induce a weak calcium release signal, both cytosolic and nucleoplasmic, that promotes (possibly with other signaling cascades) the activation of transcription factors, leading to the expression or repression of genes involved in muscle phenotype. This hypothesis was tested by blocking IP3R during unloading of rat muscles by administering 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate). Wistar rats were administered intraperitoneally at a dose of 10 mg/mg in 5% DMSO daily. We found that the IP3R state influences the development of atrophic processes in the postural *m. soleus* during unloading. Administration of the IP3R blocker 2-APB to animals successfully prevented a decrease in *m. soleus* cross-sectional area (CSA) of both fast and slow muscle fibers. The slowdown in CSA decrease upon administration IP3R inhibitor during 7 days *m. soleus* unloading is associated with the prevention of a decrease in ribosomal biogenesis and an increase in the expression of autophagy markers ULK-1 and IL-6.

Keywords: skeletal muscle, atrophy, IP3-receptors

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**D-СЕРИН СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО СЕРОТОНИНА
В МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ И УСИЛИВАЕТ
ФОРМИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ СТРАХА У КРЫС**

© 2024 г. Н. Б. Саульская^{1,*}, М. А. Сусорова¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,

Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: saulskeyanb@infran.ru

Поступила в редакцию 20.07.2024 г.

После доработки 12.08.2024 г.

Принята к публикации 14.08.2024 г.

D-серин является эндогенным агонистом глицинового сайта NMDA-рецепторов. Однако его вклад в организацию функций медиальной префронтальной коры (мПК) исследован мало. Целью работы было изучение участия D-серина в мПК в формировании и генерализации условной реакции страха (УРС – модель страха), а также в регуляции выброса серотонина в этой области. На крысах линии Спрег-Дули методами прижизненного внутримозгового диализа и ВЭЖХ показано, что введение D-серина (1мМ) в мПК снижает в ней базальный уровень внеклеточного серотонина и уменьшает на фоне такого снижения рост данного показателя во время выработки УРС (сочетание условного сигнала (CS+) с неизбежным болевым раздражением), но не в ходе дифференцировки I (предъявление дифференцировочного сигнала (CS–) без болевого раздражения). Введение в мПК D-серина уменьшало во время выработки УРС замирание животных на CS+ (показатель пассивного ожидания болевого раздражения) и увеличивало горизонтальную двигательную активность и число стоек (попытки избежать болевого раздражения). Такое фармакологическое воздействие приводило через сутки к усилению замирания на потенциально опасный CS+, но не на безопасный CS–. Полученные данные впервые свидетельствуют, что D-сериновая стимуляция мПК, снижающая выброс серотонина в этой области, усиливает в ходе выработки УРС активную стратегию поведения животных, направленную на избегание, и тормозит пассивную стратегию ожидания болевого раздражения. Это сопровождается усилением формирования и/или консолидации УРС, но не влияет на ее генерализацию.

Ключевые слова: D-серин, NMDA-рецепторы, выброс серотонина, условная реакция страха, медиальная префронтальная кора, прижизненный внутримозговой микродиализ

DOI: 10.31857/S0869813924090095, **EDN:** AJSTYG

ВВЕДЕНИЕ

Оптический изомер серина D-серин является эндогенным агонистом глицинового сайта NMDA-рецепторов глутамата. В ЦНС млекопитающих D-серин присутствует в виде свободной аминокислоты в концентрациях, коррелирующих с плотностью

NMDA-рецепторов [1]. Высокое содержание D-серина выявлено в корковых областях, в том числе в медиальной префронтальной коре (мПК), где на его долю приходится около 20% серина [2]. D-серин продуцируется преимущественно нейронами (90%) и в меньшей степени астроцитами (10%) в результате рацемизации L-серина, катализируемой серин-рацемазой [3]. Высвобождение D-серина, участвующего в функциональной активации NMDA-рецепторов, тоже осуществляют нейроны (постсинаптические участки) [4] и астроциты [5, 6]. При этом астроциты обеспечивают захват D-серина из внеклеточного пространства и его ферментативную деградацию [7], а также являются источником L-серина, участвующего в синтезе D-серина [8].

В литературе накапливаются данные о вкладе D-серина и D-серин-зависимой активации NMDA-рецепторов ЦНС в механизмы обучения и памяти [6], включая память о страхе [9–11]. Продemonстрировано, что дисфункция D-сериновой системы ЦНС может быть вовлечена в патогенез ряда психических расстройств, характеризующихся патологическими изменениями проявлений страха [1, 3]. Одним из основных центров контроля страха является мПК, участвующая в формировании и генерализации памяти о страхе [12]. Кроме того, мПК играет важную роль в регуляции высших когнитивных процессов, в том числе в выборе стратегии поведения и в обеспечении его гибкости [13]. Следует отметить, что мПК является единственной областью коры, посылающей проекции к ядрам шва [14], что позволяет ей управлять активностью серотониновых нейронов, иннервирующих многие отделы ЦНС [15]. В частности, показано, что мПК генерирует и передает сигнал о контролируемости стресса нейронам ядер шва, снижающий выброс серотонина в ряде структур переднего мозга [15]. Это способствует усилению избежательных реакций на стресс и ослаблению пассивных форм реагирования (замирание) [15]. Вклад D-сериновых сигналов мПК в такую регуляцию не изучен.

В ряде исследований показано участие NMDA-зависимой нейротрансмиссии в прелимбическом отделе мПК в выработке и/или консолидации условной реакции страха (УРС, модель страха) [16, 17], а также в генерализации УРС [16, 18]. Вместе с тем отсутствуют сведения о роли в этих процессах D-сериновых механизмов мПК.

Ранее мы установили, что выработка УРС (сочетание условного сигнала (CS+) с неизбежаемым электрокожным раздражением) сопровождается выбросом серотонина в мПК, усиливающим будущую генерализацию УРС (проявления страха на безопасный дифференцировочный раздражитель (CS-)), но не влияющим на память о потенциально опасном CS+ [19]. Однако неизвестно, могут ли локальные D-сериновые сигналы изменять выброс серотонина в мПК и как это соотносится с формированием и генерализацией УРС.

Цель работы заключалась в исследовании вклада D-сериновой активации NMDA-рецепторов мПК в регуляцию выброса серотонина в этой корковой области, в выбор активной или пассивной поведенческой стратегии в ответ на неизбежаемый болевой стресс при выработке УРС, а также в процессы формирования и генерализации УРС. Для этого было изучено влияние введения в мПК в ходе выработки УРС D-серина (1мМ), во-первых, на изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК; во-вторых, на активные (перемещения, стойки) и пассивные (замирание) поведенческие ответы в ходе выработки УРС; в-третьих, на проявления УРС (замирание на CS+) и на генерализацию УРС (замирание на CS-) через сутки после выработки УРС. Таких сведений в литературе нет.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали самцов крыс линии Спрег-Дули массой 325–420 г (возраст 3–4 месяца) из ЦКП «Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных сис-

тем» (Санкт-Петербург). В ходе экспериментов животных содержали индивидуально при естественном режиме освещенности. Доступ к воде и лабораторному корму был свободным.

Крысам под наркозом (рометар, «Sporpha», Чешская Республика, 1.4 мг/100 г и золетил, «Virbac Sante Animale», Франция, 5 мг/100 г, внутримышечно) в правую мПК по стереотаксическим координатам черепа имплантировали микродиализные канюли [20]. Для предотвращения послеоперационного воспаления крысам вводили антибиотик бициллин-5 («Синтез», Россия, 30000 ЕД/100 г, внутримышечно). Эксперименты начинали через сутки после имплантации. Они включали два этапа (рис. 1) – этап обучения (экспериментальный день 1) и этап тестирования (экспериментальный день 2). Для детального описания см. [21].

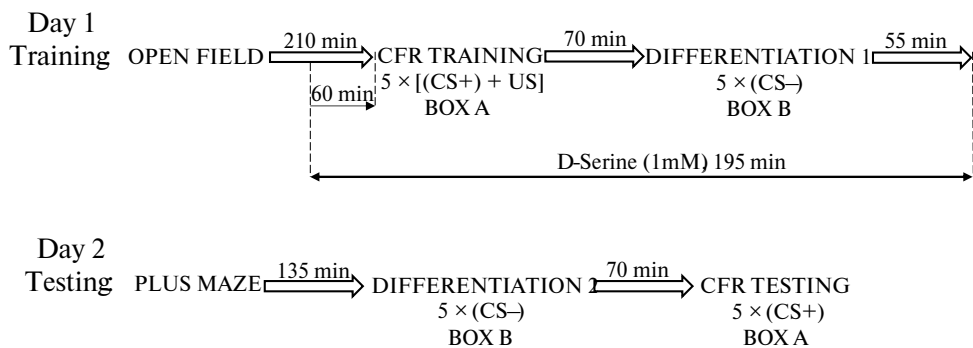


Рис. 1. Схема эксперимента. (CS+) – условный сигнал; (CS-) – дифференцировочный сигнал; US – безусловный стимул (электрокожное раздражение).

В начале экспериментального дня каждую крысу тестировали в установке «Открытое поле» в течение 5 мин для оценки изначального уровня подвижности. Регистрировали горизонтальную двигательную активность, оцениваемую по пересечениям границ секторов установки, и число стоек. Затем животное помещали в дневной бокс и начинали процедуру микродиализа мПК искусственной спинномозговой жидкостью (ИСМЖ, 1 мкл/мин). После стабилизационного периода (1 ч) и сбора 5 фоновых порций диализата (по 15 мин каждая) животных разделяли на 2 группы: «D-Serine» ($n = 9$) и «Без введения» ($n = 12$). Каждой крысе группы «D-Serine» в ИСМЖ, прокачиваемую через диализную канюлю, вводили D-серин (1 мМ, «MP Biomedicals», США) и собирали 4 порции диализата (по 15 мин каждая). Затем, не прерывая процедуру введения D-серина в мПК и сбора диализата, проводили выработку УРС. Крысу на 5 мин помещали в камеру А (желтые стены, решетчатый пол) и предъявляли условный сигнал (CS+, непрерывный тон, 1000 Гц, 10 с, 5 раз, интервал 50 с) в сочетании с неизбегаемым электрокожным раздражением, подаваемым через решетку пола (0.5 мА, 1 с). Регистрировали следующие параметры: 1) время замирания на CS+ (с), отражающее ожидание болевого раздражения; 2) время замирания в межсигнальных интервалах (с); 3) активные формы поведения – горизонтальную двигательную активность (пересечения границ секторов камеры) и стойки, отражающие попытки животного избежать болевого раздражения. После этого крысу возвращали в дневной бокс и через 70 мин проводили дифференцировку 1. Животное переносили на 5 мин в камеру В (белый пол, белые стены) и предъявляли дифференцировочный сигнал (CS-, прерывистый тон 1000 Гц, 10 с, 5 раз, интервал 50 с) без болевого раз-

дражения. Регистрировали время замирания на CS- (с), отражающее первоначальную генерализацию УРС, время замирания в межсигнальных интервалах, горизонтальную двигательную активность (пересечения) и число стоек. Затем животное возвращали в бокс на 55 мин, после чего сбор диализата завершали и отмывали канюлю от D-серина, пропуская через нее ИСМЖ (1 мкл/мин, 15 мин). Животных группы «Без введения» подвергали тем же процедурам, но без добавления D-серина в ИСМЖ для перфузии мПК.

На следующий день (экспериментальный день 2, этап тестирования) с крысами обеих групп проводили три последовательных поведенческих теста (рис. 1). Сначала животных в течение 5 мин тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте. Регистрировали следующие параметры поведения в закрытых и открытых рукавах лабиринта: 1) горизонтальную двигательную активность (по пересечению границ секторов); 2) число стоек/свешиваний; 3) длительность пребывания (с). После этого возобновляли диализную перфузию мПК ИСМЖ и через 2 ч проводили дифференцировку 2 так же, как дифференцировку 1. Регистрировали длительность замирания (с) на CS- и в межсигнальных интервалах параметры, отражающие генерализацию УРС. Через 70 мин проводили тестирование животных на проявления УРС. Животных помещали на 5 мин в камеру А и предъявляли CS+ так же, как при выработке УРС, но без болевого раздражения. Проявления условнорефлекторного страха оценивали по замиранию животных (с) на CS+ и в межсигнальных интервалах.

Мы не можем полностью исключить влияние послеоперационного стресса и наркоза, а также самой диализной перфузии на изучаемые показатели, но животные сравниваемых групп находились в равных условиях.

Определение уровня серотонина в диализате мПК осуществляли методом ВЭЖХ (LC-10ATVP, «Shimadzu», Германия) с электрохимической детекцией (Procede «Antec Leyden», Нидерланды), как было описано ранее [21]. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали аппаратно-программный комплекс МультиХром 1.72 («Амперсенд», Россия). Концентрацию серотонина в диализате мПК выражали в нМ, а затем – в процентах к собственному среднему фоновому уровню перед тестами. После окончания экспериментов животных забивали и проводили морфологический контроль попаданий, как описано ранее [19]. В статистическую обработку включали крыс с локализацией канюль в мПК (преимущественно прелимбический отдел).

Статистическую обработку проводили с использованием пакета SigmaStat (3.0). Данные представляли как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Сравнимые выборки проверяли на нормальность распределения методом Колмогорова – Смирнова и далее применяли методы параметрической статистики, если данные удовлетворяли критерию нормальности, или непараметрической статистики, если не удовлетворяли. Для сравнения изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно собственного фонового уровня в ходе поведенческих тестов, проводимых на фоне введения или без введения D-серина в мПК, использовали однофакторный дисперсионный анализ Фридмана для повторяющихся замеров (хи-квадрат, фактор – время) и критерий Ньюмана – Килса для апостериорного сравнения. Для выяснения влияния введения D-серина на базальный уровень внеклеточного серотонина в мПК перед поведенческими тестами (начало эксперимента) применяли однофакторный дисперсионный анализ для повторяющихся замеров (F-критерий, фактор – время). Для межгруппового сравнения изменений уровня серотонина использовали двухфакторный дисперсионный анализ (F-критерий, факторы – время и группа) и критерий Ньюмана – Килса для апостериорного сравнения. Парное сравнение параметров поведения проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, если сравниваемые выборки соответствовали нормальному распределению, или с помощью критерия Манна – Уитни, если не соответствовали. Использовали уровень достоверности $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Перед началом микродиализных экспериментов крысы групп «D-Serine» ($n = 9$) и «Без введения» ($n = 12$) не различались между собой по величине горизонтальной двигательной активности (рис. 2, $t = 0.06$, $p = 0.95$) и числу стоек (рис. 2, $t = 1.6$, $p = 0.12$) в тесте «Открытое поле».

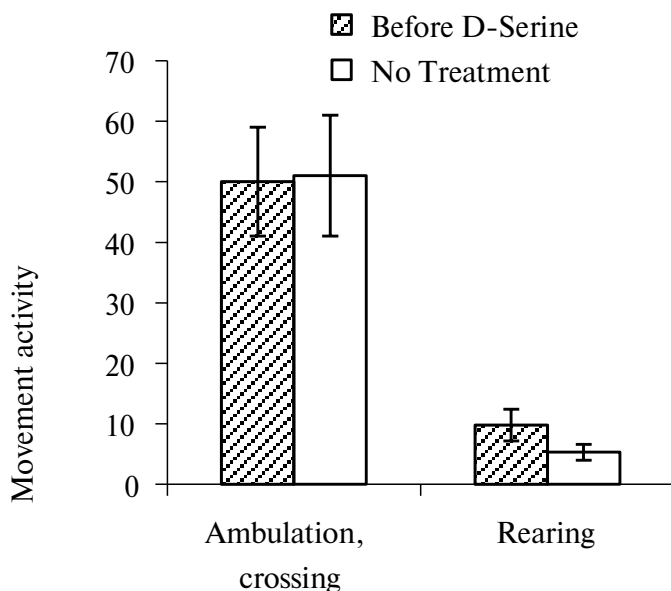


Рис. 2. Горизонтальная двигательная активность, пересечения (Ambulation, crossing) и число стоек (Rearing) в тесте «Открытое поле» у крыс до введения D-серина в мПК (Before D-Serine) и у животных без введения D-серина (No Treatment). Достоверных отличий не найдено, t -критерий Стьюдента.

По данным однофакторного дисперсионного анализа, выработка УРС у крыс группы «Без введения» сопровождалась ростом уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно фоновому уровню перед тестом (рис. 3), что соответствует ранее опубликованным нами данным [21]. Животные этой группы не демонстрировали достоверных изменений уровня серотонина в мПК в ходе дифференцировки 1 (рис. 3).

Введение D-серина (1 мМ) в мПК крыс группы «D-Serine» сопровождалось снижением базального уровня внеклеточного серотонина в этой области (рис. 3) относительно фона перед введением. Однофакторный дисперсионный анализ, охватывающий весь период введения D-серина, показал, что такое фармакологическое воздействие влияет на динамику изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе поведенческих тестов (хи-квадрат = 66.5, $k = 17$, $p < 0.001$, критерий Фридмана). По данным апостериорного анализа, выработка УРС и дифференцировка 1 у животных группы «D-Serine» приводили к подъему уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно этого показателя непосредственно перед тестами (соответственно $q = 8.8$, $p < 0.05$ и $q = 7.1$, $p < 0.05$, критерий Ньюмана – Килса), но не относительно фоновому

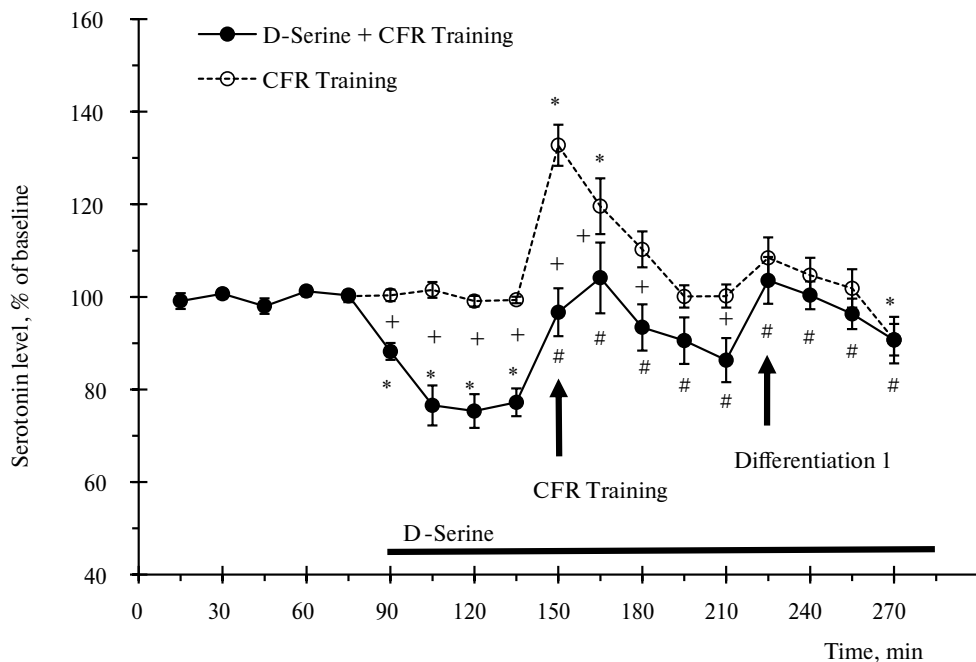


Рис. 3. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в процессе выработки УРС (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс, подвергавшихся (D-Serine + CFR Training) и не подвергавшихся (CFR Training) введению в мПК D-серина. Выработка УРС приводила к подъему уровня серотонина в мПК (хи-квадрат = 57.5, $k = 13$, $p < 0.001$, критерий Фридмана, однофакторный дисперсионный анализ). Введение 1мМ D-серина снижало базальный уровень серотонина в мПК ($F_{(8, 64)} = 27.4$, $p < 0.001$, F-критерий, однофакторный дисперсионный анализ) и на этом фоне уменьшало его подъем во время выработки УРС ($F_{(13, 266)} = 3.8$, $p < 0.001$, F-критерий, двухфакторный дисперсионный анализ). Ось X – время, мин; ось Y – уровень внеклеточного серотонина, % к фону; разброс на графике – ошибка среднего; стрелки – поведенческие тесты; горизонтальная линия – период введения D-серина. * – $p < 0.05$ – при сравнении с фоном (критерий Ньюмана – Килса); + – $p < 0.05$ – при межгрупповом сравнении (критерий Ньюмана – Килса); # – $p < 0.05$ – при сравнении с уровнем серотонина, измененным введением D-серина перед тестом (критерий Ньюмана – Килса).

уровня перед введением препарата (соответственно $q = 3.8$, $p > 0.05$ и $q = 0.7$, $p > 0.05$, критерий Ньюмана – Килса).

Межгрупповое сравнение выявило влияние группы на изменения уровня серотонина в ходе выработки УРС относительно фонового уровня (рис. 3). А именно, крысы группы «D-Serine» во время выработки УРС характеризовались меньшим уровнем внеклеточного серотонина в мПК по сравнению с животными группы «Без введения» ($q = 9.4$, $p < 0.001$, критерий Ньюмана – Килса). Группы не различались между собой по уровню серотонина в мПК во время дифференцировки 1 ($q = 1.1$, $p = 0.4$, критерий Ньюмана – Килса).

Введение в мПК D-серина во время выработки УРС уменьшало в ходе этого теста замирание животных на CS+ (рис. 4а) и в межсигнальных интервалах (рис. 4б) по сравнению с соответствующими показателями крыс группы «Без введения». При этом во время дифференцировки 1 животные с введением и без введения D-серина в мПК не

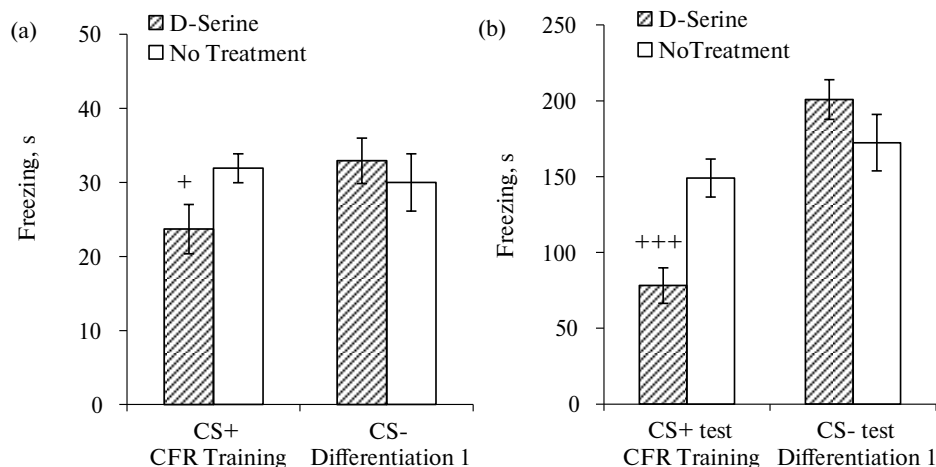


Рис. 4. (а) – Длительность замирания на звуковые сигналы (CS+, CS-, с) и (б) в межсигнальных интервалах (CS+ test, CS- test, с) во время выработки УРС (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением в мПК 1мМ D-серина (D-Serine) и у животных, не подвергавшихся введению препарата (No Treatment). Введение D-серина уменьшало замирание на CS+ и в межсигнальных интервалах во время выработки УРС. + – $p = 0.04$, $t = 2.3$; +++ – $p < 0.001$, $t = 3.9$ – при межгрупповом сравнении (t -критерий Стьюдента).

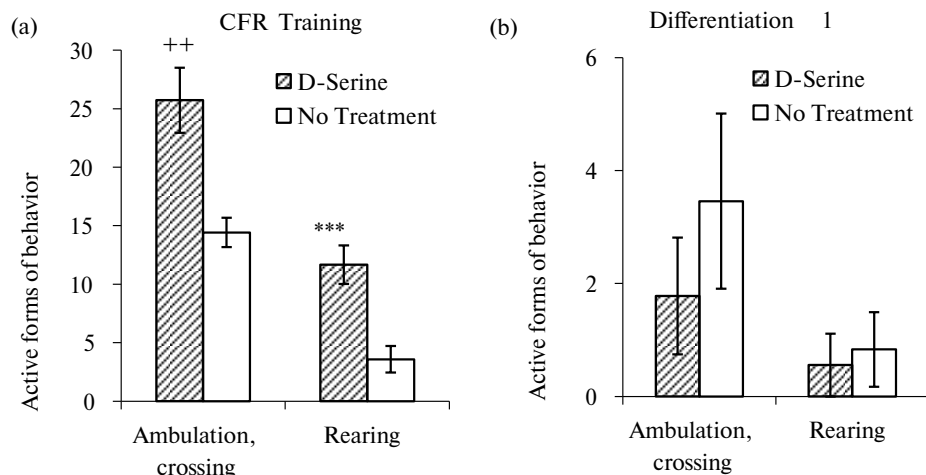


Рис. 5. Увеличение горизонтальной двигательной активности (пересечения), (Ambulation, crossing lines) и числа стоек (Rearing) (а) во время выработки УРС (CFR Training), (б) но не во время дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением D-серина (D-Serine) в мПК при сравнении с крысами без введения D-серина (No Treatment). ++ – $p = 0.02$ (критерий Манна – Уитни); *** – $p < 0.001$, $t = 4.2$ (t -критерий Стьюдента) – при межгрупповом сравнении. Остальные обозначения, как на рис. 3.

различались между собой по замиранию на CS- (рис. 4а, $t = 0.6$, $p = 0.6$) и в межсигнальных интервалах (рис. 4б, $t = 1.2$, $p = 0.3$).

Сравнение активных форм поведения животных на этапе обучения, отражающих активные попытки избежать болевого раздражения, показало, что у крыс группы «D-серин» во время выработки УРС наблюдалось увеличение горизонтальной двигательной активности и числа стоек (рис. 5а) по сравнению с величиной этих параметров у крыс группы «Без введения». Вместе с тем во время дифференцировки 1 не было обнаружено различий между животными с введением и без введения D-серина в мПК по этим показателям (рис. 5б, $p = 0.51$ и $p = 0.50$ соответственно, критерий Манна – Уитни).

Через сутки после выработки УРС в ходе дифференцировки 2 животные, подвергнутые накануне введению D-серина в мПК, не отличались от крыс группы «Без введения» по замиранию на безопасный CS- (рис. 6а, $t = 1.1$, $p = 0.3$, t -критерий Стьюдента) и в межсигнальных интервалах (рис. 6а, $p = 0.8$, критерий Манна – Уитни). Однако во время тестирования УРС животные группы «D-серин» демонстрировали большее замирание на потенциально опасный CS+ (рис. 6б) и в интервалах между CS+ (рис. 6б) по сравнению с крысами группы «Без введений».

При тестировании в крестообразном лабиринте через сутки после выработки УРС мы не обнаружили достоверных различий между крысами групп «D-серин» и «Без введения» по следующим параметрам: по времени пребывания в закрытых и в открытых рукавах лабиринта (рис. 7а, соответственно $p = 0.45$ и $p = 0.5$); по горизонтальной двигательной активности в закрытых и открытых рукавах лабиринта (рис. 7б, соответственно $p = 0.3$ и $p = 0.5$). У крыс группы «D-серин» наблюдалась тенденция к увеличению числа стоек в закрытых рукавах лабиринта (рис. 7с; $p = 0.06$, критерий Манна – Уитни).

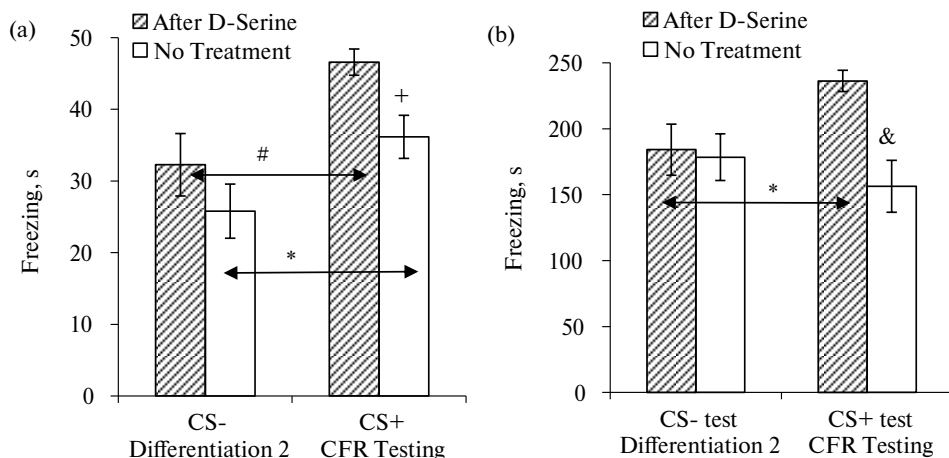


Рис. 6. (а) – Длительность замирания на звуковые сигналы (CS- или CS+, с) и (б) – Длительность замирания в межсигнальных интервалах (CS+ test, CS- test, с) во время дифференцировки 2 (Differentiation 2) и при тестировании УРС (CFR Testing) у крыс, ранее подвергавшихся (After D-Serine) и не подвергавшихся (No Treatment) введению в мПК 1мМ D-серина. Введение D-серина увеличивало замирание на CS+ (+ $p = 0.01$, $t = 2.7$, t -критерий Стьюдента) и в межсигнальных интервалах & $-p = 0.004$, (критерий Манна – Уитни) во время тестирования УРС. * $-p < 0.05$, (t -критерий Стьюдента) и # $-p < 0.05$ (критерий Манна – Уитни) – при сравнении между тестами.

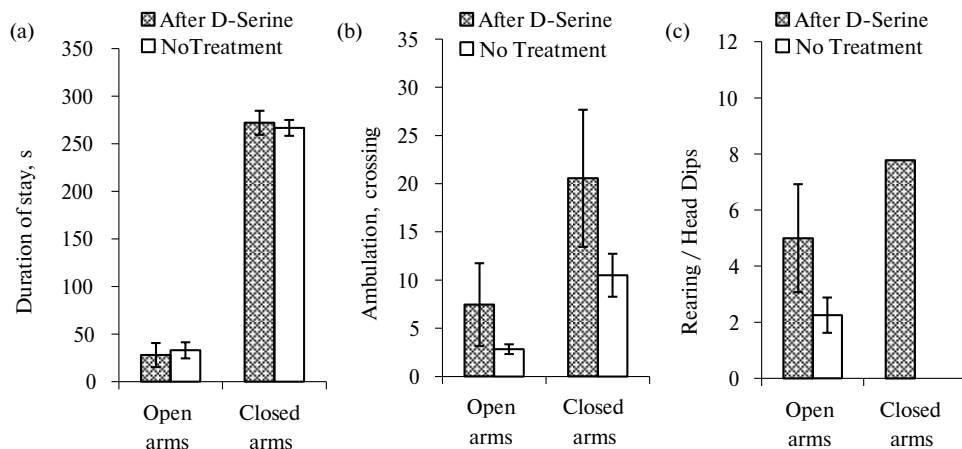


Рис. 7. (а) – Длительность пребывания, с, (б) – Горизонтальная двигательная активность (Ambulation), пересечения, (с) – Стойки/свеивания в открытых (Open arms) и закрытых (Closed arms) рукавах крестообразного лабиринта у крыс, ранее подвергавшихся (After D-Serine) и не подвергавшихся (No Treatment) введению в мПК 1мМ D-серина. Достоверных отличий не найдено, критерий Манна – Уитни.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

NMDA-зависимая нейропластичность играет важную роль в обеспечении функций мПК, в том числе связанных с формированием и регуляцией памяти о страхе [18, 22, 23]. В частности, на крысах продемонстрировано, что активация NMDA-рецепторов мПК после выработки УРС локальным введением NMDA способствует консолидации условнорефлекторного страха обстановки [16], что проявляется в усилении замирания животных (показатель страха) в камере, ранее сочетавшейся с болевым раздражением.

Основным результатом настоящей работы являются данные, впервые показавшие, что стимуляция мПК D-серином, агонистом глицинового сайта NMDA-рецепторов, может вносить весомый вклад в формирование и/или консолидацию памяти о страхе. Об этом свидетельствует тот факт, что введение в мПК во время и после выработки УРС D-серина увеличивает через сутки замирание крыс на условный (CS+) и обстановочный (камера А в интервалах между CS+) сигналы (рис. 6а, б). Этот результат, во-первых, подтверждает данные литературы, продемонстрировавшие, что стимуляция глицинового сайта NMDA-рецепторов мозга циклосерином, частичным агонистом этого сайта, усиливает консолидацию УРС на звуковые и обстановочные сигналы [24]. Во-вторых, он показывает, что влияние такого системного воздействия на NMDA-рецепторы может быть опосредовано D-серин-зависимыми механизмами мПК.

Следует отметить, что показанное в работе влияние D-серина на замирание, вызываемое потенциально опасными стимулами, не является следствием отсроченного действия препарата на подвижность и тревожность животных, так как крысы с введением и без введения D-серина в мПК не различались между собой через сутки по длительности пребывания (рис. 6а) и подвижности (рис. 7б, с) в закрытых и открытых рукавах крестообразного лабиринта, а также по замиранию на безопасные раздражители (CS- и камеру В) во время дифференцировки 2 (рис. 6а, б). Последнее, кроме того, свидетельствует, что D-сериновые механизмы мПК не вносят заметный вклад в генерализацию реакции страха в этих экспериментах.

Вместе с тем в нескольких работах, использующих методы активации и генетического удаления NMDA-рецепторов мПК, показано вовлечение NMDA-зависимых процессов в этой корковой области в генерализацию УРС, проявляющуюся в замирании животных на безопасные сигналы [16, 18]. Сопоставление этих данных с результатами настоящей работы позволяет сделать вывод, что D-сериновый компонент активации NMDA-рецепторов мПК, видимо, в большей степени связан с формированием УРС, в то время как общая активация NMDA-рецепторов мПК важна и для формирования УРС, и для ее генерализации.

Такая избирательность действия D-серина, возможно, вызвана разной функциональной ролью подтипов NMDA-рецепторов [22] в сочетании с их различиями в чувствительности к коагонистам, D-серину и глицину [25]. Об этом свидетельствует следующее. Во-первых, есть данные, что в синаптических (NR2A-содержащих) NMDA-рецепторах в качестве коагониста преимущественно используется D-серин, а в несинаптических (NR2B-содержащих) NMDA-рецепторах – глицин [25]. Во-вторых, продемонстрировано вовлечение NR2A-содержащих, но не NR2B-содержащих NMDA-рецепторов мПК в формирование УРС на обстановочные и на отсроченные звуковые сигналы [22]. Взятые вместе эти литературные данные предполагают возможное участие регулируемых D-серином NMDA-рецепторов мПК в формировании УРС на звуковые и обстановочные стимулы. Результаты настоящей работы, приведенные выше, подтверждают это предположение.

В работе показан ранее неизвестный факт, что выработка УРС на фоне введения D-серина в мПК сопровождается уменьшением замирания животных на CS+ и камеру А во время этого теста с параллельным усилением активных форм поведения (горизонтальная двигательная активность, стойки), отражающих безуспешные попытки животных избежать болевого раздражения (рис. 5а). Причем такие изменения поведения не связаны с общей двигательной активацией животных под действием препарата, поскольку не наблюдаются при дифференцировке I (рис. 5б). Этот результат перекликается с литературными данными, что увеличение уровня D-серина в ЦНС мышей влечет за собой прием D-серина с питьевой водой или в результате усиления экспрессии серин-рацемазы уменьшает периоды неподвижности в тесте «Вынужденное плавание» без изменения двигательной активности в тесте «Открытое поле» [26], то есть мобилизует ресурсы мозга на активные поиски выхода, хотя и в другой поведенческой ситуации. Наши результаты позволяют предположить, что D-сериновые механизмы мПК могут опосредовать эту важную функцию.

Вероятным механизмом, запускающим такие изменения поведения, может быть стимуляция D-серином группы пирамидных нейронов мПК, вовлекаемых, по данным литературы [15], в передачу сигнала о контролируемости стресса ГАМКергическим интернейронам ядер шва и через них – серотониновым нейронам (рис. 8). мПК генерирует такой сигнал в естественных условиях, если животное может избежать или ограничить болевой стресс [15]. Его назначение – затормозить вызываемую стрессом активацию серотониновых нейронов, снизить выброс серотонина в связанных с реакцией на стресс областях мозга, включая мПК [27], и переключить за счет этого стратегию поведения животных с пассивной (замирание) на активную (поиски выхода) [15]. Введение D-серина в мПК может имитировать такой сигнал за счет стимуляции NMDA-рецепторов на пирамидных нейронах этой области, что и вызывает, как мы думаем, перечисленные выше поведенческие и нейрохимические эффекты. А именно, локальное введение D-серина в мПК приводило в наших экспериментах к снижению базального уровня внеклеточного серотонина в этой области и на этом фоне ограничивало его функциональный подъем во время выработки УРС (рис. 3), подавляло пассивные (рис. 4а, б) и усиливало активные (рис. 5а) формы поведения. Следует отметить, что в литературе есть сведения о вовлечении NMDA-рецепторов в тормозную регуляцию базального выброса серотонина в мПК [28]. Значимый результат работы – в ней впервые

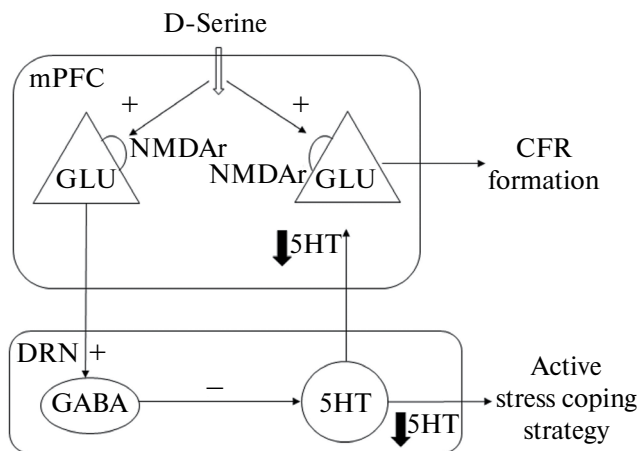


Рис. 8. Предполагаемый механизм влияния D-серина на выброс серотонина в мПК и на поведение животных во время выработки и тестирования УРС, базирующийся на результатах данной статьи и на анализе Maier [15]. mPFC – мПК, DRN – дорсальное ядро шва, GLU – глутамат, GABA – ГАМК, 5HT – серотонин, NMDAr – NMDA-рецептор, CFR formation – выработка УРС, + – активация, — – торможение. Черная стрелка – снижение уровня серотонина в ответ на неизбежный стресс.

продемонстрирована модуляция данной функции NMDA-рецепторов мПК D-серином и показано, что такая модуляция может иметь функциональные последствия, выражающиеся в активизации попыток животного предотвратить болевое раздражение.

Таким образом, полученные в работе новые данные свидетельствуют, что D-сериновая стимуляция мПК в ходе выработки УРС, снижающая выброс серотонина в этой области, усиливает попытки животного избежать болевого раздражения, являющегося неизбежным в данном поведенческом тесте. Это, возможно, усиливает авersiveность болевого подкрепления и, как следствие, приводит к усилению формирования и/или консолидации УРС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность м.н.с. Надежде Анатольевне Трофимовой за помощь в проведении экспериментов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Планирование работы (Н. Б. С.), проведение экспериментов (М. А. С., Н. Б. С.), статистическая обработка и анализ данных (Н. Б. С., М. А. С.), написание и редактирование статьи (Н. Б. С., М. А. С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411629–7–3.1.4). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 04/19 от 19.04.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nishikawa T* (2011) Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J Chromatogr B* 879: 3169–3183.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.08.030>
2. *Umino A, Ishiwata S, Iwama H, Nishikawa T* (2017) Evidence for tonic control by the GABA_A receptor of extracellular D-Serine concentrations in the medial prefrontal cortex of rodents. *Front Mol Neurosci* 10: 271–338.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00240>
3. *Guercio GD, R Panizutti* (2018) Potential and challenges for the clinical use of D-serine as a cognitive enhancer. *Front Psychiatry* 9: 14.
<https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00014>
4. *Wong JM, Folorunso OO, Barragan EV, Berciu C, Harvey TL, Coyle JT, Balu DT, Gray JA* (2020) Postsynaptic Serine Racemase Regulates NMDA Receptor Function. *J Neurosci* 40: 9564–9575.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1525–20.2020>
5. *Abreu DS, Gomes JJ, Ribeiro FF, Diógenes MJ, Sebastião AM, Vaz SH* (2023) Astrocytes control hippocampal synaptic plasticity through the vesicular-dependent release of D-Serine. *Front Cell Neurosci* 17: 1282841.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1282841>
6. *Koh W, Park M, Chun YE, Lee J, Shim HS, Park MG, Kim S, Sa M, Joo J, Kang H, Oh S-J, Woo J, Chun H, Lee SE, Hong J, Feng J, Li Y, Ryu H, Cho J, Lee CJ* (2021) Astrocytes render memory flexible by releasing D-serine and regulating NMDA receptor tone in the hippocampus. *Biol Psychiatry* 91: 740–752.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.10.012>
7. *Krishnan KS, Billups B* (2023) ASC Transporters mediate D-serine transport into astrocytes adjacent to synapses in the mouse brain. *Biomolecules* 13: 819.
<https://doi.org/10.3390/biom13050819>
8. *Neame S, Safory H, Radziszewsky I, Wolosker H* (2019) The NMDA receptor activation by D-serine and glycine is controlled by an astrocytic Phgdh-dependent serine shuttle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 20736–20742.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1909458116>
9. *Balu DT, Presti KT, Huang CCY, Muszynski K, Radziszewsky I, Wolosker H, Guffanti G, Ressler KJ, Coyle JT* (2018) Serine racemase and D-serine in the amygdala are dynamically involved in fear learning. *Biol Psychiatry* 83: 273–283.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.012>
10. *Inoue R, Ni X, Mori H* (2023) Blockade of D-serine signaling and adult hippocampal neurogenesis attenuates remote contextual fear memory following multiple memory retrievals in male mice. *Front Neurosci* 16: 1030702.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1030702>
11. *Inoue R, Talukdar G, Takao K, Miyakawa T, Mori H* (2018) Dissociated role of D-serine in extinction during consolidation vs. reconsolidation of context conditioned fear. *Front Mol Neurosci* 11: 161.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00161>
12. *Xu W, Sudhof TC* (2013) A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339: 1290–1295.
<https://doi.org/10.1126/science.1229534>
13. *Pastor V, Medina JH* (2021) Medial prefrontal cortical control of reward- and aversion-based behavioral output: Bottom-up modulation. *Eur J Neurosci* 53: 3039–3062.
<https://doi.org/10.1111/ejn.15168>

14. *Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH* (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82: 443–468.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00268-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00268-6)
15. *Maier SF* (2015) Behavioral control blunts reactions to contemporaneous and future adverse events: medial prefrontal cortex plasticity and a corticostriatal network. *Neurobiol Stress* 1: 12–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.09.003>
16. *Vanvossen AC, Portes MAM, Scoz-Silva R, Reichmann HB, Stern CAJ, Bertoglio LJ* (2017) Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiol Learn Mem* 137: 154–162.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.002>
17. *Heroux NA, Horgan CJ, Stanton ME* (2021) Prefrontal NMDA-receptor antagonism disrupts encoding or consolidation but not retrieval of incidental context learning. *Behav Brain Res* 405: 113175.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113175>
18. *Vieira PA, Corches A, Lovelace JW, Westbrook KB, Mendoza M, Korzus E* (2015) Prefrontal NMDA receptors expressed in excitatory neurons control fear discrimination and fear extinction. *Neurobiol Learn Mem* 119: 52–62.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.012>
19. *Saul'skaya NB, Marchuk OE* (2020) Inhibition of serotonin reuptake in the medial prefrontal cortex during acquisition of a conditioned reflex fear reaction promotes formation of generalized fear. *Neurosci Behav Physiol* 50: 432–438.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00918-x>
20. *Saul'skaya NB, Sudorgina PV* (2016) Activity of the nitroergic system of the medial prefrontal cortex in rats with high and low levels of generalization of a conditioned reflex fear reaction. *Neurosci Behav Physiol* 46: 964–970.
<https://doi.org/10.1007/s11055-016-0338-2>
21. *Saul'skaya NB, Susorova MA, Trofimova NA* (2023) Effect of nitric oxide synthase inhibitors on serotonin release in medial prefrontal cortex during conditioned fear response acquisition and generalization in rats. *J Evol Biochem Physiol* 59: 1700–1709.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023050204>
22. *Gilmartin MR, Kwapis JL, Helmstetter FJ* (2013) NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex differentially mediate trace, delay, and contextual fear conditioning. *Learn Mem* 20: 290–294.
<https://doi.org/10.1101/lm.053894.123>
23. *Chen QY, Li XH, Zhuo M* (2021) NMDA receptors and synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex. *Neuropharmacology* 197: 108749.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108749>
24. *Handford CE, Tan S, Lawrence AJ, Kim JH* (2014) The effect of the mGlu5 negative allosteric modulator MTEP and NMDA receptor partial agonist D-cycloserine on Pavlovian conditioned fear. *Int J Neuropsychopharmacol* 17: 1521–1532.
<https://doi.org/10.1017/S1461145714000303>
25. *Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet J-P, Oliet SHR* (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150: 633–664.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.029>
26. *Otte D-M, Barcena de Arellano ML, Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Imbeault S, Jeung H, Alferink J, Zimmer A* (2013) Effects of Chronic D-Serine Elevation on Animal Models of Depression and Anxiety-Related Behavior. *Plos One* 8: e67131
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067131>
27. *Bland ST, Hargrave D, Pepin JL, Amat J, Watkins LR, Maier SF* (2003) Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 28: 589–596.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300206>
28. *Ceglia I, Carli M, Baviera M, Renoldi G, Calcagno E, Invernizzi RW* (2004) The 5-HT_{2A} receptor antagonist M100,907 prevents extracellular glutamate rising in response to NMDA receptor blockade in the mPFC. *Neurochem J* 91: 189–199.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02704.x>

D-Serine Reduces Extracellular Serotonin Level in the Medial Prefrontal Cortex and Enhances the Formation of Fear Response in Rats

N. B. Saulskaya^{a, *}, and M. A. Susorova^a

^aPavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

**e-mail: saulskayanb@infran.ru*

D-serine is an endogenous agonist of the glycine site of NMDA receptors. However, its contribution to the medial prefrontal cortex (mPFC) functions has been little studied. The purpose of the work was to study the involvement of D-serine in the mPFC in the formation and generalization of the conditioned fear response (CFR – a fear model), as well as in the regulation of serotonin release in this area. In Sprague-Dawley rats by means of *in vivo* microdialysis and HPLC analysis, we showed that the intra-mPFC infusion of D-serine (1 mM) reduces the basal level of extracellular serotonin in this area and decreases its rise during CFR acquisition (paired presentation of a conditioned cue (CS+) and inescapable footshock but not during differentiation 1 (presentation of a differentiation cue (CS-) alone). The intra-mPFC D-serine infusion reduced animals' freezing to CS+ (a measure of passive footshock anticipation) during the CFR acquisition and increased ambulation and the number of rearing (attempts to escape footshock). This pharmacological treatment, a day after it, increased animals' freezing to the potentially dangerous CS+, but did not affect freezing to the safe CS-. The data obtained indicate for the first time that, with a decrease in the release of serotonin in the mPFC, stimulation of the mPFC by D-serine enhances the animals' active strategy of avoiding shock and suppresses the passive strategy of anticipating it.

This is accompanied by increased acquisition and/or consolidation of the CFR, but does not affect its generalization.

Keywords: D-serine, NMDA receptors, serotonin release, conditioned fear response, medial prefrontal cortex, *in vivo* intracranial microdialysis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЗАИМОСВЯЗЬ ВЯЗКОСТИ КРОВИ И АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ У НОРМОТЕНЗИВНЫХ И СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

© 2024 г. А. М. Анищенко^{1,2}, А. В. Сидехменова^{1,*}, О. И. Алиев¹, О. А. Уляхина¹,
О. И. Дунаева¹, М. Б. Плотников¹

*¹Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины
им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук, Томск, Россия*

*²Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Томск, Россия*

**E-mail: sidehmenova@yandex.ru*

Поступила в редакцию 18.06.2024 г.

После доработки 14.08.2024 г.

Принята к публикации 21.08.2024 г.

Повышенная вязкость цельной крови может вносить существенный вклад в увеличение общего периферического сопротивления, нарушение системной гемодинамики и расстройство микроциркуляции при артериальной гипертензии. Однако изменение вязкости крови (ВК) также приводит к изменению напряжения сдвига на эндотелии, что может оказать влияние на тонус сосудов. Исследований взаимосвязи изменений ВК и артериального давления у животных в условиях артериальной гипертензии не проводилось. Целью работы было исследование связи артериального давления с вязкостью крови в норме, а также в условиях снижения и повышения вязкости крови у нормотензивных крыс Вистар и спонтанно гипертензивных крыс линии SHR с использованием корреляционного анализа. Снижение/повышение ВК проводили с помощью изоводемической гемодилюции/гемоконцентрации. Среднее артериальное давление (СрАД) регистрировали с помощью системы MP150 (Biopac Systems, Inc., США). ВК измеряли на ротационном вискозиметре Brookfield DV-II+Pro (Brookfield Engineering Labs Inc., США) на скорости сдвига 450 с⁻¹. У нормотензивных крыс отсутствовала статистически значимая корреляция между исходными значениями ВК и СрАД. После изоводемической гемодилюции или гемоконцентрации у нормотензивных крыс статистически значимых корреляций между ВК и СрАД также не было обнаружено. У крыс SHR, по сравнению с крысами Вистар, выявлена значимая положительная статистическая связь средней силы между исходными значениями ВК и СрАД ($R = 0.643$, $p < 0.05$). У этих животных сохранялись статистически значимые корреляционные связи средней силы между значениями ВК и СрАД как после гемодилюции ($R = 0.530$, $p < 0.05$), так и после гемоконцентрации ($R = 0.689$, $p < 0.05$). Анализ корреляционных связей показывает, что у крыс SHR, в отличие от крыс Вистар, артериальное давление пассивно следует за изменением вязкости крови, что, вероятно, обусловлено несостоятельностью механизмов эндотелийзависимой вазодилатации при артериальной гипертензии.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, артериальное давление, вязкость крови, спонтанно гипертензивные крысы линии SHR, нормотензивные крысы Вистар

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция артериального давления осуществляется сложной многокомпонентной системой как в норме, так и при патологии. Существует ряд высокоэффективных и хорошо переносимых лекарственных средств, которые действуют на различные элементы системы регуляции артериального давления. Однако показатели контроля артериального давления далеки от удовлетворительных [1].

Одним из важных звеньев патогенеза артериальной гипертензии (АГ) является синдром повышенной вязкости крови [2–4]. Доказано, что при АГ повышенная вязкость цельной крови может вносить существенный вклад в увеличение общего периферического сопротивления, нарушение системной гемодинамики и расстройство микроциркуляции [2–4]. Между вязкостью крови и артериальным давлением существуют сложные взаимосвязи [3, 5]. С одной стороны, повышение вязкости крови приводит к увеличению общего периферического сопротивления [6]. С другой стороны, вязкость крови определяет напряжение сдвига как механический стимул, который запускает сигнальный каскад, приводящий к активации NO-синтазы эндотелиальных клеток, что стимулирует вазодилатацию. [7]. Таким образом, увеличение вязкости крови может вызывать два противоположных эффекта: прямое увеличение гемодинамического сопротивления и косвенное – снижение сосудистого сопротивления, вызванное эндотелий-опосредованной, зависящей от скорости сдвига вазодилатацией [8]. Вязкость крови определяет напряжение сдвига на стенке сосуда, что является одним из механизмов, обеспечивающих адекватный приток крови к тканям. Поэтому характер взаимосвязи вязкости крови, тонуса сосудов и артериального давления в значительной степени определяет состояние системной гемодинамики и микроциркуляции при АГ [9].

Авторы, описывающие снижение тонуса сосудов и артериального давления при повышении вязкости крови, указывают, что этот феномен наблюдается у здоровых пациентов и в пределах нормальных вариаций вязкости крови [10]. При АГ повышенное артериальное давление оказывает повреждающее действие на сосудистый эндотелий [11–13], что приводит к снижению вазодилатирующей функции эндотелия в ответ на гуморальные стимулы [13–15] с развитием эндотелиальной дисфункции [16, 17]. Кроме того, у больных АГ формируется синдром повышенной вязкости крови [2–4], а повышенная вязкость отрицательно влияет на функцию эндотелия [18]. При этом остается неизученным вопрос: сохраняется ли при АГ механизм регуляции тонуса сосудов и артериального давления при изменении вязкости крови, реализующийся через изменение напряжения сдвига на эндотелии.

Изучение взаимосвязи вязкости крови и артериального давления у людей проводится с использованием корреляционной связи этих параметров, причем большинство исследований выполнено на практически здоровых субъектах [9, 19–23]. В экспериментальных работах изменение артериального давления в зависимости от изменения вязкости крови оценивали на нормотензивных животных (золотистых сирийских хомяках и мышах CD-1), а также на мышах с нокаутом гена эндотелиальной NO-синтазы и на моделях животных с использованием N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME) [24]. Исследований взаимосвязи вязкости крови и артериального давления у животных в условиях эссенциальной АГ не проводилось.

Целью работы было исследование связи артериального давления с вязкостью крови в норме, а также в условиях снижения и повышения вязкости крови у нормотензивных крыс Вистар и спонтанно гипертензивных крыс линии SHR с использованием корреляционного анализа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 40 аутбредных крысах – самцах Вистар в возрасте 12–13 недель, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра, и 40 спонтанно гипертензивных крысах – самцах линии SHR в возрасте 12–13 недель, полученных из вивария Института биологической химии РАН, г. Пушкино.

В виварии Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга животные содержались в неполной барьерной системе при следующих параметрах окружающей среды: температура – 20–24 °С, относительная влажность – $50 \pm 20\%$, воздухообмен 12–15 объемов помещения в час, световой режим – 12 / 12 ч. Эксперименты проводили под изофлурановым наркозом. Для ингаляции изофлурана использовали аппарат для наркоза Ugo Basile 21050 (Ugo Basile, Италия).

Снижение и повышение вязкости крови воспроизводили у крыс методами гемодилюции и гемоконцентрации. Снижение вязкости крови производили с помощью изоволемической гемодилюции, которую осуществляли путем эквиволемной замены 10% объема циркулирующей крови на плазму, полученную от крысы-донора. Повышение вязкости крови производили с помощью изоволемической гемоконцентрации, которую осуществляли путем эквиволемной замены 10% объема циркулирующей крови на эритроцитарную массу, полученную от крысы-донора. Объем циркулирующей крови определяли для каждой крысы из расчета 7.5% от массы тела животного [25]. Процедуры изоволемической гемодилюции или изоволемической гемоконцентрации проводили у крыс-реципиентов путем эксфузии крови из яремной вены и одновременной изоволемической трансфузии соответственно плазмы или эритроцитарной массы от крысы-донора в бедренную вену со скоростью 0.17 мл/мин. Забор крови у крыс-доноров производили через катетер из общей сонной артерии, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Кровь центрифугировали с ускорением 1600 g в течение 15 мин на центрифуге СМ-6 для получения плазмы и эритроцитарной массы.

Влияние условий эксперимента (наркоз, хирургические манипуляции, процедура эксфузии/трансфузии крови без изменения гематокрита) было изучено в отдельных контрольных группах. В группу контроль I входили нормотензивные крысы Вистар ($n = 10$). Группу контроль II составили крысы линии SHR ($n = 6$). Животным из контрольных групп I и II была проведена процедура гемотрансфузии без изменения гематокрита.

Было выделено 4 опытные группы: в группе опыт I исследовали влияние изоволемической гемодилюции у крыс Вистар ($n = 10$); в группе опыт II – влияние изоволемической гемоконцентрации у крыс Вистар ($n = 10$); в группе опыт III – влияние изоволемической гемодилюции у крыс SHR ($n = 10$); в группе опыт IV – влияние изоволемической гемоконцентрации у крыс SHR ($n = 10$).

Вязкость крови оценивали до и через 30 мин после трансфузии. Уровень среднего артериального давления (СрАД) регистрировали непрерывно в течение всего эксперимента. Вязкость цельной крови измеряли на ротационном вискозиметре Brookfield DV-II+Pro (Brookfield Engineering Labs Inc., США) на скорости сдвига 450 c^{-1} при температуре 36 °С. СрАД регистрировали в общей сонной артерии с использованием высокоскоростной системы сбора и анализа данных MP150 (Biopac Systems, Inc., США) с усилителем DA100C и датчиком TSD104A с программным обеспечением «AcqKnowledge 4.2 for MP150».

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего значения. Для оценки статистической значимости различий использовали непараметрические критерии Kruskal–Wallis и Mann–Whitney U-test. Корреляционную связь вязкости крови и артериального давления оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (Spearman R).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вязкость крови в группах контроль I и контроль II до и после изоводемической гемотрансфузии статистически значимо не изменялась. В группе животных контроль I и контроль II через 30 мин после изоводемической гемотрансфузии происходило небольшое, но статистически значимое снижение СрАД на 9% и 11% соответственно по сравнению с исходными значениями, что, очевидно, связано с условиями эксперимента, в частности, действием изофлуранового наркоза [26].

Исходные значения вязкости крови и СрАД у нормотензивных крыс составляли 3.68 ± 0.03 мПа·с и 105 ± 1 мм рт. ст. соответственно. Снижение вязкости крови после гемодилюции (на 15%, $p < 0.05$) у крыс группы опыт I и повышение вязкости крови после гемоконцентрации (на 16%, $p < 0.05$) у крыс группы опыт II сопровождалось снижением артериального давления (на 10 и 5% соответственно), статистически значимо не отличавшимся от снижения в группе контроль I.

У нормотензивных крыс отсутствовала статистически значимая корреляция между исходными значениями исследуемых показателей ($R = -0.014$, $p > 0.05$) (рис. 1а). Статистически значимых корреляций между вязкостью крови и СрАД у нормотензивных крыс также не было обнаружено как после изоводемической гемодилюции ($R = -0.067$, $p > 0.05$), так и после изоводемической гемоконцентрации ($R = -0.072$, $p > 0.05$) (рис. 1б, с).

Исходные значения вязкости крови и СрАД у спонтанно гипертензивных крыс составляли 3.99 ± 0.02 мПа·с и 142 ± 2 мм рт. ст. соответственно и были статистически значимо выше, чем у нормотензивных животных. Снижение вязкости крови (на 19%, $p < 0.05$) у крыс в группе опыт III приводило к статистически более значимому снижению СрАД (на 20%, $p < 0.05$) по сравнению с группой контроль II.

У крыс в группе опыт IV повышение вязкости крови (на 11%, $p < 0.05$) приводило к снижению СрАД (на 11%, $p < 0.05$) и статистически значимо не отличалось от снижения давления в группе контроль II.

У крыс SHR, в отличие от крыс Вистар, наблюдалась значимая положительная статистическая связь средней силы между исходными значениями вязкости крови и СрАД ($R = 0.643$, $p < 0.05$) (рис. 1а) и сохранялись статистически значимые корреляционные связи средней силы между значениями вязкости крови и СрАД как после гемодилюции ($R = 0.530$, $p < 0.05$), так и после гемоконцентрации ($R = 0.689$, $p < 0.05$) (рис. 1б, с). Выявленные с помощью корреляционного анализа взаимосвязи у спонтанно гипертензивных крыс свидетельствуют о пассивном изменении артериального давления вслед за изменением вязкости крови на высокой скорости сдвига.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов исследования корреляционной связи между вязкостью крови и артериальным давлением у здоровых лиц свидетельствует о том, что они носят неоднозначный характер. В большинстве исследований выявлена положительная корреляция слабой степени. Так, Smith с соавт. показали, что вязкость крови положительно коррелировала с систолическим и диастолическим артериальным давлением независимо от возраста и индекса массы тела; коэффициент ранговой корреляции находился в пределах 0.16–0.21 ($p < 0.001$) [19]. Вязкость цельной крови у 105 здоровых доноров

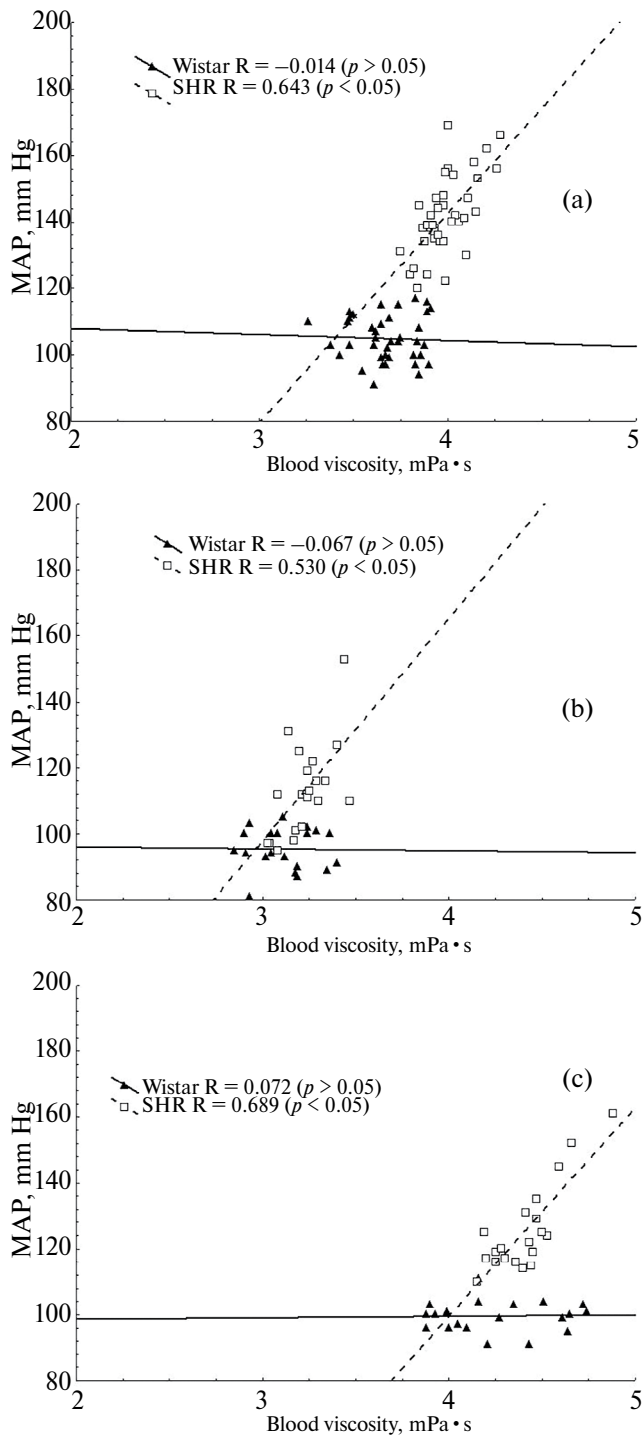


Рис. 1. Корреляционная зависимость вязкости крови (450 с^{-1}) и СрАД у крыс Вистар и крыс SHR. (а) – исходные значения, (б) – после гемодилюции, (с) – после гемоконцентрации.

крови коррелировала с систолическим артериальным давлением ($r = 0.29$, $p = 0.003$) [20]. В исследовании, проведенном de Simone с соавт., систолическое, диастолическое и среднее артериальное давление коррелировали с вязкостью крови при всех скоростях сдвига ($r = 0.24$ – 0.26 для систолического артериального давления, $r = 0.24$ – 0.28 для диастолического артериального давления и $r = 0.26$ – 0.29 для среднего артериального давления; $0.007 < p < 0.001$) [21]. В когортном исследовании Gori с соавт. в группе 3223 практически здоровых субъектов выявлена линейная положительная связь слабой степени между вязкостью и артериальным давлением [9]. Позже de Simone с соавт. показали наличие отрицательной корреляции слабой степени ($R = -0.104$, $p < 0.05$) вязкости крови и систолического артериального давления при отсутствии корреляции вязкости крови и диастолического артериального давления [22]. Irace с соавт. у 103 здоровых добровольцев (68 мужчин и 35 женщин) без факторов сердечно-сосудистого риска не выявили связи между вязкостью крови и систолическим артериальным давлением ($r = 0.131$, $p > 0.05$), в то время как была обнаружена положительная связь вязкости крови с диастолическим артериальным давлением ($r = 0.285$, $p < 0.05$) [23]. В исследовании Letcher с соавт. в объединенной группе здоровых лиц и больных АГ описана слабая, но статистически значимая положительная корреляция между значениями вязкости крови на высокой и низкой скоростях сдвига, с одной стороны, и значениями систолического, диастолического и среднего артериального давления – с другой [27]. Эти и другие авторы не проводили исследований корреляционной связи между вязкостью крови и параметрами артериального давления в группе больных АГ.

Изменение вязкости крови способно оказывать влияние на сосудистое сопротивление [2, 6]. Вязкость крови, определяющая напряжение сдвига на стенке сосуда, является ключевым модулятором продукции оксида азота эндотелиальной NO-синтазой [7, 28]. В норме при повышении напряжения сдвига на эндотелии увеличивается синтез оксида азота эндотелием, что приводит к расширению сосудов и снижению артериального давления [7, 28]. Вызванная блокатором NO-синтазы L-NAME дисфункция эндотелия приводила к пассивному следованию артериального давления за изменениями вязкости крови [24], что является доказательством существования феномена ауторегуляции тонуса сосудов и артериального давления при изменении вязкости крови в норме. Отсутствие статистически значимых корреляционных связей вязкости крови и артериального давления у нормотензивных крыс в наших экспериментах представляется вполне закономерным и может свидетельствовать о сохранении участия эндотелия в поддержании стабильного уровня артериального давления после снижения/повышения вязкости крови у нормотензивных крыс.

Эндотелиальные клетки играют ключевую роль в регуляции кровяного давления и кровотока благодаря их способности реагировать на гуморальные факторы крови и механическое воздействие, создаваемое кровотоком в виде напряжения сдвига на поверхности эндотелиоцитов [7, 29, 30]. Основным механизмом, регулирующим тонус периферических сосудов и артериальное давление в ответ на изменение напряжения сдвига в области эндотелия сосудов, является продукция оксида азота эндотелиальной NO-синтазой [31]. Существование этого механизма было подтверждено экспериментами, в которых введение L-NAME животным с нормальным уровнем артериального давления блокировало продукцию оксида азота эндотелием и выключало данную реакцию [24, 32]. В этих условиях всякое возрастание гематокрита и вязкости крови сопровождалось прогрессивным повышением артериального давления, снижением сердечного выброса и кровотока в мозге и почках. У мышей с нокаутом эндотелиальной NO-синтазы отсутствует индуцированная ацетилхолином вазодилатация и развивается АГ [33, 34]. В отличие от нормотензивных крыс Вистар, у крыс SHR (в норме, в условиях гемодилюции и гемоконцентрации) в наших экспериментах выявлена статистически значимая корреляция средней степени, отражающая существование отчетливой взаимосвязи артериального давления с вязкостью крови. Положительные значения этой связи свидетельствуют

о том, что при возрастании вязкости крови связанное с этим увеличение сосудистого сопротивления является преобладающим над эндотелийзависимой вазодилатацией, обусловленной повышением напряжения сдвига на эндотелии.

У больных АГ выявлено снижение вазодилатирующей функции эндотелия в ответ на гуморальные стимулы и снижение доступности NO [14, 15]. Нами показано, что у крыс SHR в возрасте 12-ти недель наблюдается снижение индекса вазодилатирующей активности эндотелия за счет уменьшения сосудорасширяющей реакции на внутривенное введение эндотелийзависимого вазодилатора ацетилхолина [35, 36]. Можно предположить, что у крыс SHR в этом возрасте пассивное следование артериального давления за изменением вязкости крови обусловлено несостоятельностью механизмов эндотелийзависимой регуляции тонуса артериальных сосудов.

Таким образом, анализ корреляционных связей показывает, что у крыс SHR, в отличие от крыс Вистар, артериальное давление пассивно следует за изменением вязкости крови, что, вероятно, обусловлено несостоятельностью механизмов эндотелийзависимой вазодилатации при артериальной гипертензии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование исследования (А. М. А., М. Б. П., О. И. А.), выполнение экспериментальной работы (А. М. А., А. В. С., О. А. У., О. И. Д.), обработка данных (А. М. А., А. В. С., О. А. У., О. И. Д.), написание и редактирование рукописи (А. М. А., М. Б. П., О. И. А., А. В. С., О. А. У., О. И. Д.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда № 23–25–00175, <https://rscf.ru/project/23–25–00175/>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра (протокол № 207A012023 от 30.01.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mancia G, Kreutz R, Brunström M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A, Muiesan ML, Tsioufis K, Agabiti-Rosei E, Algharably EAE, Azizi M, Benetos A, Borghi C, Hitij JB, Cifkova R, Coca A, Cornelissen V, Cruickshank JK, Cunha PG, Danser AHJ, Pinho RM, Delles C, Dominiczak AF, Dorobantu M, Dourmas M, Fernández-Alfonso MS, Halimi JM, Járαι Z, Jelaković B, Jordan J, Kuznetsova T, Laurent S, Lovic D, Lurbe E, Mahfoud F, Manolis A, Miglinas M, Narkiewicz K, Niiranen T, Palatini P, Parati G, Pathak A, Persu A, Polonia J, Redon J, Sarafidis P, Schmieder R, Spronck B, Stabouli S, Stergiou G, Taddei S, Thomopoulos C, Tomaszewski M, Van de Borne P, Wanner C, Weber T, Williams B, Zhang ZY, Kjeldsen SE (2023) ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). J Hypertens 41(12): 1874–2071. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003480>*

2. *Meiselman HJ, Baskurt OK* (2006) Hemorheology and hemodynamics: Dove andare? *Clin Hemorheol Microcirc* 35(1–2): 37–43.
3. *Sloop G, Holsworth RE Jr, Weidman JJ, St Cyr JA* (2015) The role of chronic hyperviscosity in vascular disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 9(1): 19–25.
<https://doi.org/10.1177/1753944714553226>
4. *Valeanu L, Ginghina C, Bubenek-Turconi S* (2022) Blood Rheology Alterations in Patients with Cardiovascular Diseases. *Rom J Anaesth Intensive Care* 28(2): 41–46.
<https://doi.org/10.2478/rjaic-2021-0007>
5. *Forconi S, Gori T* (2009) The evolution of the meaning of blood hyperviscosity in cardiovascular physiopathology: should we reinterpret Poiseuille? *Clin Hemorheol Microcirc* 42(1): 1–6.
<https://doi.org/10.3233/CH-2009-1186>
6. *Nader E, Skinner S, Romana M, Fort R, Lemonne N, Guillot N, Gauthier A, Antoine-Jonville S, Renoux C, Hardy-Dessources MD, Stauffer E, Joly P, Bertrand Y, Connes P* (2019) Blood Rheology: Key Parameters, Impact on Blood Flow, Role in Sickle Cell Disease and Effects of Exercise. *Front Physiol* 10: 1329.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01329>
7. *Davis MJ, Earley S, Li YS, Chien S* (2023) Vascular mechanotransduction. *Physiol Rev* 103(2): 1247–1421.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00053.2021>
8. *Salazar Vázquez BY, Martini J, Chávez Negrete A, Tsai AG, Forconi S, Cabrales P, Johnson PC, Intaglietta M* (2010) Cardiovascular benefits in moderate increases of blood and plasma viscosity surpass those associated with lowering viscosity: Experimental and clinical evidence. *Clin Hemorheol Microcirc* 44(2): 75–85.
<https://doi.org/10.3233/CH-2010-1261>
9. *Gori T, Wild PS, Schnabel R, Schulz A, Pfeiffer N, Blettner M, Beutel ME, Forconi S, Jung F, Lackner KJ, Blankenberg S, Münzel T* (2015) The distribution of whole blood viscosity, its determinants and relationship with arterial blood pressure in the community: cross-sectional analysis from the Gutenberg Health Study. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 9(6): 354–365.
<https://doi.org/10.1177/1753944715589887>
10. *Salazar Vázquez BY, Martini J, Chávez Negrete A, Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M* (2009) Microvascular benefits of increasing plasma viscosity and maintaining blood viscosity: counterintuitive experimental findings. *Biorheology* 46(3): 167–179.
<https://doi.org/10.3233/БИР-2009-0539>
11. *Kim HL* (2023) Arterial stiffness and hypertension. *Clin Hyperten* 29(1): 31.
<https://doi.org/10.1186/s40885-023-00258-1>
12. *Drożdż D, Drożdż M, Wójcik M* (2023) Endothelial dysfunction as a factor leading to arterial hypertension. *Pediatr Nephrol* 38(9): 2973–2985.
<https://doi.org/10.1007/s00467-022-05802-z>
13. *Tang EH, Vanhoutte PM* (2010) Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Arch–Eur J Physiol* 459(6): 995–1004.
<https://doi.org/10.1007/s00424-010-0786-4>
14. *Weil BR, Stauffer BL, Greiner JJ, DeSouza CA* (2011) Prehypertension is associated with impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent vasodilation in sedentary adults. *Am J Hypertens* 24: 976–981.
<https://doi.org/10.1038/ajh.2011.88>
15. *Maio R, Suraci E, Caroleo B, Politi C, Gigliotti S, Sciacqua A, Andreozzi F, Perticone F, Perticone M* (2021) New-Onset Diabetes, Endothelial Dysfunction, and Cardiovascular Outcomes in Hypertensive Patients: An Illness-Event Model Analysis. *Biomedicines* 9(7): 721.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9070721>
16. *Gallo G, Volpe M, Savoia C* (2022) Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. *Front Med (Lausanne)* 20(8): 798958.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.798958>
17. *Konukoglu D, Uzun H* (2017) Endothelial dysfunction and hypertension. *Adv Exp Med Biol* 956: 511–540.
https://doi.org/10.1007/5584_2016_90
18. *Sandhagen B, Lind L* (2012) Whole blood viscosity and erythrocyte deformability are related to endothelium-dependent vasodilation and coronary risk in the elderly. The prospective investigation of the vasculature in Uppsala seniors (PIVUS) study. *Clin Hemorheol Microcirc* 50(4): 301–311.
19. *Smith WC, Lowe GD, Lee AJ, Tunstall-Pedoe H* (1992) Rheological determinants of blood pressure in a Scottish adult population. *J Hypertens* 10(5): 467–472.
<https://doi.org/10.1097/00004872-199205000-00010>

20. Fossum E, Høiegggen A, Moan A, Nordby G, Velund TL, Kjeldsen SE (1997) Whole blood viscosity, blood pressure and cardiovascular risk factors in healthy blood donors. *Blood Press* 6(3): 161–165.
<https://doi.org/10.3109/08037059709061932>
21. De Simone G, Devereux RB, Chien S, Alderman MH, Atlas SA, Laragh JH (1990) Relation of blood viscosity to demographic and physiologic variables and to cardiovascular risk factors in apparently normal adults. *Circulation* 81(1): 107–117.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.81.1.107>
22. De Simone G, Devereux RB, Chinali M, Best LG, Lee ET, Welty TK (2005) Strong Heart Study Investigators. Association of blood pressure with blood viscosity in american indians: the Strong Heart Study. *Hypertension* 45(4): 625–630.
<https://doi.org/10.3233/CH-2011-1505>
23. Irace C, Carallo C, Scavelli F, Loprete A, Merante V, Gnasso A (2012) Lack of association between systolic blood pressure and blood viscosity in normotensive healthy subjects. *Clin Hemorheol Microcirc* 51(1): 35–41.
<https://doi.org/10.3233/CH-2011-1506>
24. Martini J, Carpentier B, Negrete AC, Frangos JA, Intaglietta M (2005) Paradoxical hypotension following increased hematocrit and blood viscosity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(5): 2136–2143.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00490.2005>
25. Западнюк ИП, Западнюк ВІ, Захарія ЕА (1974) Лабораторні тварини. Київ. Вища школа. [Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, Zahariya EA Laboratory animals. Kiev. Vishcha shkola. (In Russ)].
26. Sixtus RP, Gray C, Berry MJ, Dyson RM (2021) Nitrous oxide improves cardiovascular, respiratory, and thermal stability during prolonged isoflurane anesthesia in juvenile guinea pigs. *Pharmacol Res Perspect* 9(1): e00713.
<https://doi.org/10.1002/prp2.713>
27. Letcher RL, Chien S, Pickering TG, Sealey JE, Laragh JH (1981) Direct relationship between blood pressure and blood viscosity in normal and hypertensive subjects. Role of fibrinogen and concentration. *Am J Med* 70(6): 1195–1202.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90827-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(81)90827-5)
28. Sloop GD, Pop G, Weidman JJ, St Cyr JA (2024) Hormonal Control of Blood Viscosity. *Cureus* 16(2): e55237.
<https://doi.org/10.7759/cureus.55237>
29. Baeyens N, Bandyopadhyay C, Coon BG, Yun S, Schwartz MA (2016) Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. *J Clin Invest* 126(3): 821–828.
<https://doi.org/10.1172/JCI83083>
30. Iring A, Jin YJ, Albarrán-Juárez J, Siragusa M, Wang S, Dancs PT, Nakayama A, Tonack S, Chen M, Künne C, Sokol AM, Günther S, Martínez A, Fleming I, Wetschurack N, Graumann J, Weinstein LS, Offermanns S (2019) Shear stress-induced endothelial adrenomedullin signaling regulates vascular tone and blood pressure. *J Clin Invest* 129(7): 2775–2791.
<https://doi.org/10.1172/JCI123825>. PMID: 31205027; PMCID: PMC6597232
31. Garcia V, Sessa WC (2019) Endothelial NOS: perspective and recent developments. *Br J Pharmacol* 176(2): 189–196.
<https://doi.org/10.1111/bph.14522>
32. Bonnin P, Vilar J, Levy BI (2016) Effect of normovolemic hematocrit changes on blood pressure and flow. *Life Sci* 157: 62–66.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.050>
33. Liao FF, Lin G, Chen X, Chen L, Zheng W, Raghov R, Zhou FM, Shih AY, Tan XL (2021) Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice: A Model of Spontaneous Cerebral Small-Vessel Disease. *Am J Pathol* 191(11): 1932–1945.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.02.022>
34. Allbritton-King JD, García-Cardena G (2023) Endothelial cell dysfunction in cardiac disease: driver or consequence? *Front Cell Dev Biol* 11: 1278166.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1278166>
35. Anishchenko AM, Aliev OI, Sidekhmenova AV, Shamanaev AY, Plotnikov MB (2015) Dynamics of blood pressure elevation and endothelial dysfunction in SHR rats during the development of arterial hypertension. *Bull Exp Biol Med* 159: 591–593. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3020-8>
36. Sidekhmenova AV, Aliev OI, Anishchenko AM, Dunaeva OI, Ulyakhina OA, Plotnikov MB (2024) Influence of a Decrease in Blood Viscosity on Arterial Pressure in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Bull Exp Biol Med* 176: 419–422.
<https://doi.org/10.1007/s10517-024-06038-7>

Relationship of Blood Viscosity and Blood Pressure in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats

A. M. Anishchenko^{a, b}, A. V. Sidekhmenova^{a, *}, O. I. Aliev^a, O. A. Ulyakhina^a,
O. I. Dunaeva^a, and M. B. Plotnikov^a

^aGoldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

^bDepartment of Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

* e-mail: sidekhmenova@yandex.ru

Increased viscosity of whole blood can make a significant contribution to an increase in total peripheral resistance, disruption of systemic hemodynamics and microcirculation disorders in arterial hypertension. However, changes in blood viscosity (BV) also lead to changes in shear stress on the endothelium, which can affect vascular tone. There have been no studies of the relationship between changes in BV and blood pressure in animals under conditions of arterial hypertension. The purpose of the work was to study the correlation between blood viscosity and blood pressure in normotensive Wistar rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) under normal conditions, as well as under conditions of decreased and increased blood viscosity. Reduction/increase of BV was carried out using isovolumic hemodilution/hemoconcentration. Mean arterial pressure (MAP) was recorded using the MP150 system (Biopac Systems, Inc, USA). BV was measured on a Brookfield DV-II+Pro rotational viscometer (Brookfield Engineering Labs Inc., USA) at a shear rate of 450 s^{-1} . In normotensive rats there were no statistically significant correlations between the initial values of BV and MAP. After isovolumic hemodilution or hemoconcentration in normotensive rats, statistically significant correlations between BV and MAP were also not found. In SHR, compared with Wistar rats, a significant positive statistical relationship of moderate strength was observed between the initial values of BV and MAP ($R = 0.643$, $p < 0.05$). In SHR, the identified statistically significant correlations of moderate strength between the values of BV and MAP remained, both after hemodilution ($R = 0.530$, $p < 0.05$) and after hemoconcentration ($R = 0.689$, $p < 0.05$). Analysis of correlations shows that in SHR, unlike Wistar rats, changes in blood pressure passively follow changes in blood viscosity, which is probably due to the failure of the mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in hypertension.

Keywords: arterial hypertension, blood pressure, blood viscosity, SHR rats, normotensive Wistar rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УЧАСТИЕ Ca^{2+} -АКЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ В МЕХАНИЗМАХ
ЭКЗО-ЭНДОЦИТОЗНОГО ЦИКЛА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ
В ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ СОМАТИЧЕСКОЙ
МУСКУЛАТУРЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *LUMBRICUS TERRESTRIS*

© 2024 г. Л. Ф. Нуруллин^{1,2,*}, Н. Д. Алмазов², Е. М. Волков^{2,**}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии
наук”, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

*E-mail: lenizn@yandex.ru

**E-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2024 г.

После доработки 06.08.2024 г.

Принята к публикации 27.08.2024 г.

Методами флуоресцентной микроскопии изучали участие Ca^{2+} -акцепторных белков в процессах экзо-эндоцитозного цикла квантовой секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах соматической мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Ингибирование кальциневрина, кальмодулина и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ приводило к усилению процесса эндоцитоза. Блокирование фосфорилирования синаптических белков усиливало процесс эндоцитоза, вызывало увеличение размеров общего везикулярного пула и ускоряло кругооборот синаптических везикул. Можно сделать вывод, что кальциевая модуляция экзо-эндоцитоза везикул в синапсах эволюционно-первичной соматической мускулатуры аннелид происходит при участии кальциневрина, кальмодулина и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ.

Ключевые слова: Ca^{2+} -сенсорные белки, нервно-мышечный синапс, соматические мышечные клетки, дождевой червь

DOI: 10.31857/S0869813924090116, **EDN:** AJHJYK

ВВЕДЕНИЕ

В основе квантовой секреции медиатора в нервных окончаниях лежит процесс экзо-эндоцитоза синаптических везикул. В стадии экзоцитоза везикулы сливаются в активных зонах с пресинаптической мембраной и освобождают нейромедиатор в синаптическую щель. После экзоцитоза следует эндоцитоз, который восстанавливает пул синаптических везикул [1]. Процессы рециклинга обеспечивают поддержание везикулярных пулов в нервных терминалях и тем самым сохраняют физиологический характер синаптической секреции медиатора [2]. Общая совокупность синаптических везикул подразделяется на пул, готовый к освобождению, резервный пул и рецикли-

рующий пул [3]. В механизмы экзо- и эндоцитозного цикла синаптических везикул вовлечены различные синаптические белки, в том числе Ca^{2+} -акцепторные белки [4]. Последние играют важную роль в процессах рециклинга везикул [5]. При этом роль данных белков в кругообороте везикул в нервно-мышечных синапсах эволюционно-первичной соматической мускулатуры остается до конца неясной. Отсюда целью настоящего исследования стало изучение участия Ca^{2+} -акцепторных белков, а именно: кальциневрина, кальмодулина и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ в механизмах экзо-эндоцитоза синаптических везикул в двигательных нервно-мышечных синапсах соматической мускулатуры дождевого червя.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для приготовления препарата дождевой червь *Lumbricus terrestris* разрезался сбоку по всей длине, отрезались головной и хвостовой концы, раскрывался, удалялись внутренние органы и перегородки между сегментами [6]. Далее фрагменты кожно-мускульного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали физиологическим раствором Древесы – Пакса около 30 мин при комнатной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Состав раствора (мМ): 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na_2SO_4 , 6 CaCl_2 , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. Всего в экспериментах было использовано 72 препарата дождевого червя.

Фрагменты кожно-мускульного мешка дождевого червя окрашивались липофильным флуоресцентным маркером FM2–10 (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 22 мкМ. «Загрузка» маркером FM2–10 двигательных нервных терминалей проводилась в течение 3 мин в модифицированном физиологическом растворе с высоким содержанием ионов K^+ (40 мМ, гиперкалиевый раствор), после предварительной 5-минутной инкубации с красителем FM2–10 в нормальном физиологическом растворе. В гиперкалиевом растворе происходит деполяризация мембраны нервных окончаний, что приводит к увеличению частоты спонтанной секреции нейромедиатора и усилению экзо-эндоцитозного цикла синаптических везикул. Состав гиперкалиевого раствора (мМ): 41 NaCl, 40 KCl, 43 Na_2SO_4 , 6 CaCl_2 , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. В целях уменьшения фонового свечения после загрузки красителя препарат в течение 30 мин отмывали в бескальциевом растворе следующего состава (мМ): 89 NaCl, 4 KCl, 43 Na_2SO_4 , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. Микроскопическое исследование препаратов проводилось на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с использованием водно-иммерсионного объектива $20\times/1.0$ NA. Для возбуждения эмиссии красителя FM2–10 применялся Ar лазер. Длина волны возбуждения красителя составляла 488 нм, максимум длины волны эмиссии 610 нм. Анализ изображений проводился в программе ImageJ (NIH, США; веб-сайт программы <https://imagej.net/ij/>). Поскольку наши измерения зависели от индивидуальных характеристик регистрирующей аппаратуры, за единицу измерения интенсивности флуоресценции были приняты относительные единицы.

Для ингибирования Ca^{2+} -акцепторных белков использовали следующие реактивы: циклоспорин А (Sigma-Aldrich, США), STO-609 (Sigma-Aldrich) и W-5 гидрохлорид (Sigma-Aldrich). Поскольку данные вещества плохо растворимы в воде, мы делали промежуточный раствор, содержащий органический растворитель диметилсульфоксид (DMSO, Sigma-Aldrich), в котором растворяли вещества. Далее из промежуточного раствора вещества добавлялись в нужной концентрации в физиологический раствор. Для оценки влияния DMSO на изучаемые процессы проводили контрольные эксперименты в присутствии и в отсутствие DMSO.

В экспериментах по изучению процессов эндоцитоза везикул препараты фрагментов кожно-мускульного мешка дождевого червя инкубировали в присутствии блокаторов Ca^{2+} -акцепторных белков, окрашивали FM2–10 (22 мкМ) в гиперкалиевом раство-

ре (40 мМ), отмывали в бескальциевом растворе, а затем проводили исследование на микроскопе. На полученных изображениях анализировалось среднее значение флуоресценции нервно-мышечных синапсов в контроле и после действия веществ. В следующей серии экспериментов изучались процессы экзоцитоза везикул в двигательных нервных терминалях. Для этого мышечные препараты дождевого червя окрашивали FM2–10 в гиперкалиевом растворе. Затем отмывали в течение 30 мин в бескальциевом растворе, после чего стимулировали в гиперкалиевом растворе и регистрировали флуоресценцию на 0, 3 и 5 мин «разгрузки» в контроле и после действия веществ.

В экспериментах с кальциевым хелатором ВАРТА-АМ (Sigma-Aldrich) предварительно окрашенные FM2–10 мышечные препараты инкубировали 30 мин в бескальциевом растворе с хелатором в концентрации 0.5 мМ. Затем препараты в присутствии хелатора разгружали в бескальциевом растворе (0 мМ Ca^{2+}) с высоким содержанием K^+ (40 мМ) следующего состава (мМ): 53 NaCl, 40 KCl, 43 Na_2SO_4 , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4. Потом регистрировали флуоресценцию нервно-мышечных синапсов при помощи микроскопа на 0, 3 и 5 мин «разгрузки».

В отдельной серии экспериментов проверяли выгорание красителя FM2–10. Для этого в нормальном растворе (при 4 мМ K^+) регистрировали значения флуоресценции на 0, 3 и 5 мин. Средние значения флуоресценции достоверно не отличались друг от друга. Это говорит о том, что в наших условиях эксперимента выгорание красителя не наблюдалось.

Статистическая обработка данных проводилась в программе Excel 2016 (Microsoft Corporation, США; веб-сайт программы <https://www.microsoft.com/ru-ru>). Сравнение выборочных совокупностей проводили при помощи независимого *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости 0.05. Результаты обработки значений флуоресценции приведены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Окрашивание мышечного препарата в гиперкалиевом растворе маркером FM2–10 в концентрации 22 мкМ приводило к появлению множества светящихся пятен овальной формы, которые являются кластерами синаптических образований с протекающими в них процессами экзо-эндоцитоза везикул (рис. 1).

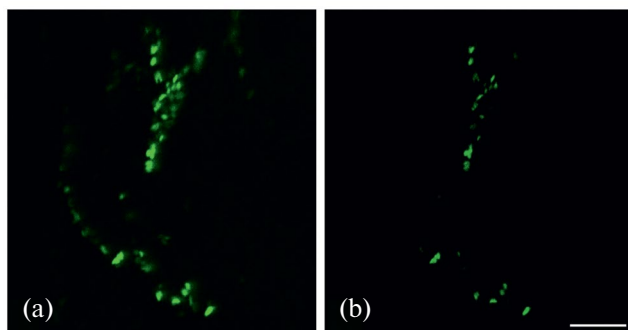


Рис. 1. Флуоресценция нервно-мышечных синапсов соматических мышечных клеток дождевого червя, загруженных липофильным красителем FM2–10. (а) – 0 мин, (б) – через 5 мин «разгрузки» красителя при 40 мМ K^+ в окружающем растворе. Масштабная линейка: 20 мкм.

Анализ флуоресцентных изображений синаптических контактов, загруженных красителем FM2–10, показал, что уровень флуоресценции составлял в контроле 88.3 ± 1.6 относительных единиц (о.е.) ($n = 62$) (рис. 2), а в присутствии 50 мкМ DMSO 86.5 ± 1.7 о.е. ($n = 67$) (рис. 2). Эти значения достоверно не отличались друг от друга ($p > 0.05$). Можно предполагать, что присутствие в окружающем растворе DMSO не оказывает существенного влияния на процессы эндоцитоза плазматических мембран в нервно-мышечных синапсах дождевого червя.

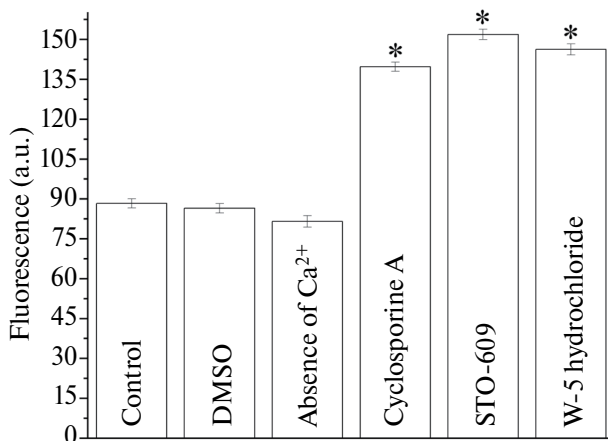


Рис. 2. Влияние DMSO, отсутствия ионов Ca^{2+} в растворе, ингибитора кальциневрина – циклоспорина А, ингибитора Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы киназы – STO-609, антагониста кальмодулина – W-5 гидрохлорида на величину флуоресценции двигательных нервных терминалей препарата соматических мышечных клеток дождевого червя, загруженных липофильным красителем FM2–10. а.у. – относительные единицы.

При окрашивании мышечного препарата в бескальциевом гиперкалиевом растворе среднее значение флуоресценции составляло 81.5 ± 2.1 о.е. ($n = 66$) (рис. 2), которое достоверно не отличалось от контроля ($p > 0.05$). Таким образом, отсутствие ионов Ca^{2+} снаружи клеток существенно не влияет на процессы эндоцитоза везикул в нервно-мышечных контактах дождевого червя. Известно, что увеличение концентрации ионов K^{+} во внешней среде приводит к деполяризации мембраны нервного окончания и возрастанию частоты спонтанной секреции медиатора в синаптическую щель [7]. Показано, что спонтанное освобождение нейромедиатора регулируется внеклеточным и внутриклеточным кальцием. Высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо регулирует спонтанный выброс в возбуждающих и тормозных синапсах [8]. В наших условиях деполяризация клеточной мембраны гиперкалиевым раствором в отсутствие ионов Ca^{2+} снаружи клетки приводит к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо и увеличению частоты спонтанной секреции медиатора, что вызывает окрашивание нервных терминалей FM2–10 в процессе экзо-эндоцитоза синаптических везикул.

Кальциневрин – это активируемая Ca^{2+} /кальмодулином серин/треониновая протеинфосфатаза, которая регулирует множество клеточных процессов, таких как экспрессия генов, ионный гомеостаз, дифференцировка мышц, секреция, эмбриогенез и т.д. [9]. Специфическое ингибирование циклоспорином А белка кальциневрина позволяет выявлять его роль в функционировании нервной системы [9]. В первичных культурах

гиппокампаальных нейронов блокирование кальциневрина угнетает эндоцитоз в синаптических терминалах [10]. Однако в нервно-мышечных соединениях дрозофилы ингибирование кальциневрина усиливает эндоцитоз везикул [11]. Наши эксперименты показали, что инкубация мышечного препарата в растворе в присутствии циклоспорина А в концентрации 10 мкМ в течение 15 мин приводила к достоверному возрастанию на 58% средней величины флуоресценции загруженных красителем FM2-10 синапсов. По сравнению с контролем значение составило 139.7 ± 1.7 о.е. ($n = 102$; $p < 0.001$) (рис. 2). Можно полагать, что ингибирование циклоспорином А белка кальциневрина приводит к усилению эндоцитоза везикул в нервно-мышечном соединении дождевого червя.

Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназа киназа (СаМКК) активирует СаМ-киназу I (СаМКI), СаМ-киназу IV (СаМКIV), протеинкиназу B (PKB/Akt) и 5'AMP-киназу (АМРК) посредством их фосфорилирования. Каскад киназ, опосредованный СаМКК, играет важную роль в ряде Ca^{2+} -зависимых путей, таких как морфогенез и пластичность нейронов, активация транскрипции, аутофагия и регуляция метаболизма [12]. СаМКК регулирует множество клеточных путей мембранного траффинга, в том числе клатрин-опосредованный эндоцитоз [13]. Препарат STO-609 ингибирует СаМКК, а также другую, не менее важную СаМК-киназу II (СаМКII) [14]. СаМКII – это наиболее распространенная киназа в возбуждающих синапсах, она ассоциирована с синаптическими везикулами, фосфорилирует большое количество синаптических белков и играет решающую роль в процессах синаптической пластичности и трансмиссии [15, 16]. Применение в наших экспериментах ингибитора STO-609 в концентрации 30 мкМ в течение 15 мин достоверно увеличивало среднее значение флуоресценции синапсов на 71% по сравнению с контролем и равнялось 151.9 ± 1.7 о.е. ($n = 112$; $p < 0.001$) (рис. 2). Таким образом, ингибирование СаМКК и СаМКII усиливало процессы эндоцитоза в нервно-мышечном контакте дождевого червя.

Кальмодулин является основным регулятором Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей в клетках, опосредуя многие физиологические процессы. При деполяризации нервной терминали Ca^{2+} /кальмодулин инициирует такие формы эндоцитоза, как клатрин-зависимый медленный эндоцитоз, балк-эндоцитоз, быстрый эндоцитоз и избыточный эндоцитоз [17]. В наших экспериментах аппликация на мышечный препарат 50 мкМ специфического антагониста кальмодулина – W-5 гидрохлорида в течение 15 мин вызвала достоверное возрастание величины флуоресценции нервных терминалей на 65% по сравнению с контролем и была равна 151.9 ± 1.7 о.е. ($n = 105$; $p < 0.001$) (рис. 2). Необходимо отметить, что средняя величина флуоресценции нервных терминалей в присутствии STO-609 или W-5 гидрохлорида была достоверно выше по сравнению с циклоспорином А ($p < 0.01$). Среднее значение флуоресценции в присутствии W-5 гидрохлорида не отличалось от флуоресценции в присутствии STO-609 ($p > 0.05$) (рис. 2). Таким образом, инактивация кальмодулина приводила к достоверному увеличению светимости двигательных нервных терминалей в мышечном препарате дождевого червя, что можно трактовать как усиление процесса эндоцитоза.

Инкубация окрашенных маркером FM2-10 мышечных препаратов в течение 3–5 мин в растворе с высоким содержанием ионов K^+ приводила к «разгрузке» красителя из нервных терминалей (рис. 3). В контрольных экспериментах на 3-й и 5-й мин происходило снижение значений флуоресценции от начального уровня на 20% и 36% соответственно (рис. 3). Абсолютные средние величины флуоресценции составили: 0 мин – 110.6 ± 3.4 о.е. ($n = 89$), 3 мин – 88.3 ± 2.6 о.е. ($n = 107$), 5 мин – 70.5 ± 2.9 о.е. ($n = 96$). Значения во всех временных точках достоверно отличались друг от друга ($p < 0.05$).

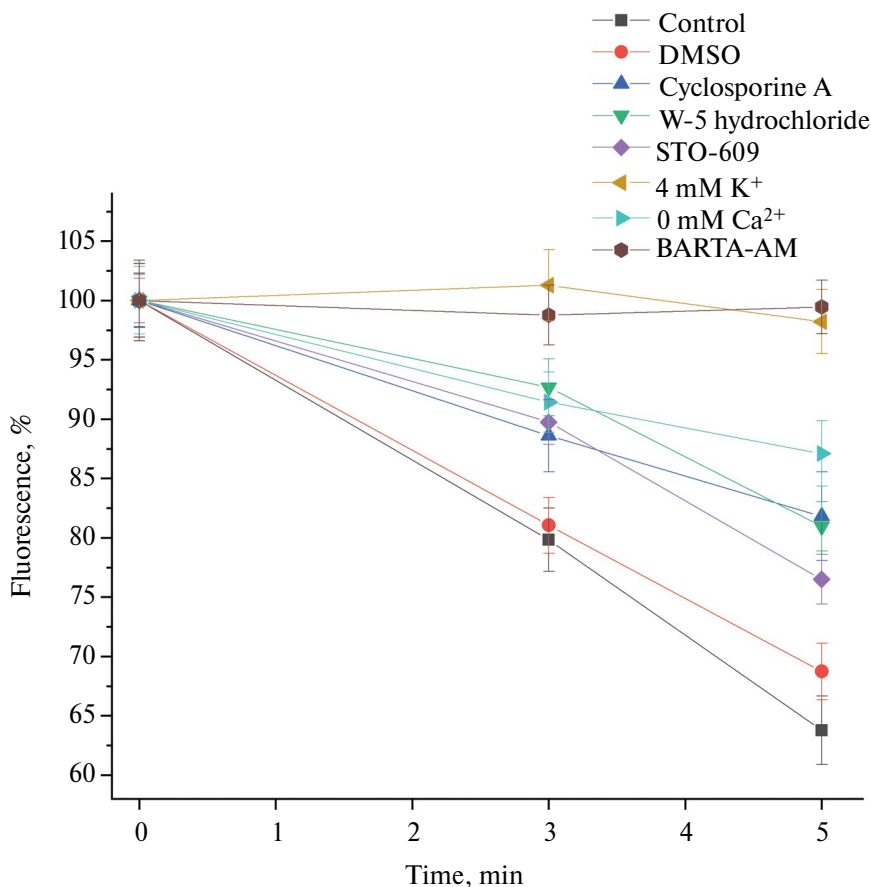


Рис. 3. Влияние ингибитора кальциневрина – циклоспорина А, ингибитора Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы киназы – STO-609, антагониста кальмодулина – W-5 гидрохлорида, отсутствия ионов Ca^{2+} в окружающем растворе (0 mM Ca^{2+}), кальциевого хелатора ВАРТА-АМ на «разгрузку» двигательных нервных терминалей препарата соматических мышечных клеток дождевого червя, окрашенных флуоресцентным красителем FM2-10. В отдельной серии экспериментов контролировалось выгорание красителя FM2-10 в нормальном растворе (4 mM K^+) в течение 5 мин.

В присутствии DMSO в гиперкалиевом растворе также происходила «разгрузка» красителя из двигательных нервных терминалей. Значения флуоресценции на 3-й и 5-й мин снизились на 19% и 31% соответственно (рис. 3). Абсолютные средние величины флуоресценции составили: 0 мин – 102.9 ± 2.3 о.е. ($n = 93$), 3 мин – 83.4 ± 2.3 о.е. ($n = 97$), 5 мин – 70.8 ± 2.4 о.е. ($n = 106$). Значения во всех временных точках достоверно отличались друг от друга ($p < 0.05$). При этом достоверных отличий между кривыми «разгрузки» в контроле и DMSO выявлено не было ($p > 0.05$).

В присутствии специфических блокаторов Ca^{2+} -сенсорных белков циклоспорина А, W-5 гидрохлорида и STO-609 динамика «разгрузки» FM2-10 замедлялась, значения флуоресценции уменьшались на 3-й мин на 7–11%, на 5-й мин на 18–22% от начального уровня (рис. 3). Абсолютные средние величины флуоресценции составили: для циклоспорина А – 0 мин – 107.7 ± 2.3 о.е. ($n = 99$), 3 мин – 95.5 ± 3.1 о.е. ($n = 117$),

5 мин – 88.1 ± 3.7 о.е. ($n = 93$); для W-5 гидрохлорида – 0 мин – 83.8 ± 2.2 о.е. ($n = 123$), 3 мин – 77.7 ± 2.4 о.е. ($n = 117$), 5 мин – 67.9 ± 2.1 о.е. ($n = 106$); для STO-609 – 0 мин – 88.8 ± 1.9 о.е. ($n = 105$), 3 мин – 79.7 ± 1.8 о.е. ($n = 107$), 5 мин – 67.9 ± 2.1 о.е. ($n = 116$). При этом во всех веществах средние значения светимости на 3-й и 5-й мин достоверно отличались от таковых в контроле и DMSO ($p < 0.05$). Таким образом, ингибирование Ca^{2+} -акцепторных белков кальциневрина, кальмодулина, CaMKK и CaMKII приводит к замедлению «разгрузки» маркера FM2–10 из двигательных нервных терминалей.

В бескальциевом гиперкалиевом растворе происходила «разгрузка» терминалей, загруженных FM2–10, однако динамика «разгрузки» красителя несколько замедлялась по сравнению с контрольной кривой и кривыми «разгрузки» в присутствии специфических блокаторов Ca^{2+} -сенсорных белков (рис. 3). При этом на 3-й и 5-й мин «разгрузки» средние значения флуоресценции в бескальциевом растворе достоверно снижались на 9% и 13% соответственно ($p < 0.05$). Абсолютные величины флуоресценции в бескальциевом растворе составили: 0 мин – 81.5 ± 2.8 о.е. ($n = 103$), 3 мин – 74.5 ± 2.5 о.е. ($n = 102$), 5 мин – 71.0 ± 2.8 о.е. ($n = 99$). Как уже было сказано выше, спонтанное освобождение везикул происходит и в отсутствие ионов Ca^{2+} во внешней среде, поэтому мы наблюдаем «разгрузку» двигательных нервных терминалей. В нашем случае «разгрузка» красителя из двигательных нервных терминалей несколько тормозится. По-видимому, кроме Ca^{2+} из внутриклеточных депо в процессе спонтанного экзо-эндоцитоза везикул в нервно-мышечном синапсе принимает участие также и внеклеточный Ca^{2+} . Эти результаты согласуются с данными литературы. Так, на центральных и периферических синапсах млекопитающих показано, что отсутствие ионов Ca^{2+} во внешней среде только частично снижало интенсивность спонтанной секреции везикул с ацетилхолином в нервных терминалях [18, 19], а Ca^{2+} , освобождающийся из внутриклеточных запасов, регулирует спонтанное квантовое освобождение нейротрансмиттера [8].

В следующей серии опытов окрашенные FM2–10 нервно-мышечные синапсы разгружали в бескальциевом гиперкалиевом растворе в присутствии проникающего в клетки кальциевого хелатора BAPTA-AM. «Разгрузка» нервных терминалей не происходила, значение флуоресценции на 3-й и 5-й мин снижалось на 1–2%, что достоверно не отличалось от начального уровня ($p > 0.05$). Абсолютные величины флуоресценции при этом составили: 0 мин – 96.0 ± 3.1 о.е. ($n = 98$), 3 мин – 94.9 ± 2.5 о.е. ($n = 101$), 5 мин – 95.5 ± 2.2 о.е. ($n = 105$). Таким образом, хелатирование внутриклеточного Ca^{2+} ингибирует спонтанную секрецию синаптических везикул, что отражается в отсутствии «разгрузки» окрашенных FM2–10 нервно-мышечных синапсов.

Известно, что реакции фосфорилирования-дефосфорилирования синаптических белков играют важную роль в рециклинге везикул. Так, дефосфорилирование синаптических белков кальциневрином влияет на фазу эндоцитоза синаптических везикул [20, 21]. В центральных синапсах гиппокампа мозга крысы размер рециклирующего пула везикул регулируется при участии CDK5/кальциневринового пути [22]. На нервно-мышечных соединениях дрозофилы показана роль кальциневрина в усилении процесса эндоцитоза, а также замедлении рециклинга синаптических везикул [11, 23]. В наших экспериментах инактивация кальциневрина увеличивала флуоресценцию загруженных FM2–10 двигательных нервных терминалей и замедляла их «разгрузку». Можно полагать, что ингибирование дефосфорилирования внутриклеточных белков приводит к увеличению интенсивности эндоцитоза и, как следствие, возрастанию размеров общего везикулярного пула и ускорению рециклинга синаптических везикул.

Кальмодулин как наиболее распространенный Ca^{2+} -акцепторный белок, связываясь с другими белками, в том числе с кальциневрином, изменяет их активность, а также способен контролировать рециклинг синаптических везикул через SNARE белковый комплекс [24]. В аудиторных синапсах ЦНС крысы восстановление пула быстро освобождаемых везикул происходит при участии белка кальмодулина [25]. Нами было показано, что ингибирование кальмодулина приводило к увеличению светимости загруженных FM2–10

синапсов и замедлению выхода маркера из терминалей при их «разгрузке» стимуляцией. Таким образом, инактивация кальмодулина также приводит к усилению процесса эндоцитоза везикул, возрастанию размеров общего везикулярного пула, а также ускорению рециклинга синаптических везикул в соматических мышцах дождевого червя.

Известно, что фермент СаМКК участвует в регуляции клеточного транспорта мембранных везикул [13]. Пресинаптическая киназа СаМКП фосфорилирует ряд ключевых белков экзоцитоза везикул, включая синтаксин, синапсин, RIM, SNARE белки и Ca^{2+} -каналы [26]. СаМКП также способна повышать подвижность синаптических везикул и облегчать спонтанное и вызванное квантовое освобождение нейромедиатора [27]. В наших экспериментах инактивация СаМКК и СаМКП в нервно-мышечных синапсах дождевого червя увеличивала флуоресценцию окрашенных FM2–10 терминалей и замедляла динамику их «разгрузки» при стимуляции. Таким образом, можно предположить, что блокирование фосфорилирования ряда ключевых синаптических белков также усиливает процесс эндоцитоза мембран, вызывает увеличение размеров общего везикулярного пула и ускоряет кругооборот синаптических везикул в соматических мышцах дождевого червя. Можно сделать вывод, что в механизмы кальциевой модуляции процессов экзо-эндоцитоза везикул в синапсах эволюционно-первичной мускулатуры аннелид вовлечены такие Ca^{2+} -акцепторные белки как кальциневрин, кальмодулин и Ca^{2+} /кальмодулин зависимые протеинкиназы. Кольчатые черви являются одними из первых животных в эволюционном ряду, которые обладают развитой мышечной системой. Полученные данные указывают на высокую генетическую стабильность системы кальциевой регуляции секреции нейромедиатора, которая, вероятно, сформировалась на ранних этапах эволюции нервно-мышечной регуляции двигательной активности у животных.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л. Ф. Н. и Е. М. В.), сбор данных (Н. Д. А.), обработка данных (Л. Ф. Н., Н. Д. А.), написание и редактирование манускрипта (Л. Ф. Н., Е. М. В.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект 23–24–00239, <https://rscf.ru/project/23–24–00239/>). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (протокол № 23/5 от 12.05.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC (2014) Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol* 76: 301–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170305>
2. Betz WJ, Wu LG (1995) Synaptic transmission. Kinetics of synaptic-vesicle recycling. *Curr Biol* 5: 1098–1101. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(95\)00220-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(95)00220-x)

3. *Rizzoli SO, Betz WJ* (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6: 57–69.
<https://doi.org/10.1038/nrn1583>
4. *Sudhof TC* (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27: 509–547.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
5. *Igarashi M, Watanabe M* (2007) Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca^{2+} concentrations. *Neurosci Res* 58: 226–233.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.03.005>
6. *Volkov EM, Nurullin LF, Nikolsky EE, Švandová I, Vyskočil F* (2000) Participation of electrogenic $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in the membrane potential of earthworm body wall muscles. *Physiol Res* 49: 481–484.
http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/49/49_481.pdf
7. *He LS, Rue MCP, Morozova EO, Powell DJ, James EJ, Kar M, Marder E* (2020) Rapid adaptation to elevated extracellular potassium in the pyloric circuit of the crab, *Cancer borealis*. *J Neurophysiol* 123: 2075–2089.
<https://doi.org/10.1152/jn.00135.2020>
8. *Williams CL, Smith SM* (2018) Calcium dependence of spontaneous neurotransmitter release. *J Neurosci Res* 96: 335–347.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24116>
9. *Creamer TP* (2020) Calcineurin. *Cell Commun Signal* 18: 137.
<https://doi.org/10.1186/s12964-020-00636-4>
10. *Kumashiro S, Lu YF, Tomizawa K, Matsushita M, Wei FY, Matsui H* (2005) Regulation of synaptic vesicle recycling by calcineurin in different vesicle pools. *Neurosci Res* 51: 435–443.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2004.12.018>
11. *Kuromi H, Kidokoro Y* (1999) The optically determined size of exo/endo cycling vesicle pool correlates with the quantal content at the neuromuscular junction of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* 19: 1557–1565.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-05-01557.1999>
12. *Tokumitsu H, Sakagami H* (2022) Molecular Mechanisms Underlying Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase Signal Transduction. *Int J Mol Sci* 23: 11025.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911025>
13. *Kennedy G, Gibson O, T O'Hare D, Mills IG, Evergren E* (2023) The role of CaMKK2 in Golgi-associated vesicle trafficking. *Biochem Soc Trans* 51: 331–342.
<https://doi.org/10.1042/bst20220833>
14. *Tokumitsu H, Inuzuka H, Ishikawa Y, Ikeda M, Saji I, Kobayashi R* (2002) STO-609, a specific inhibitor of the $\text{Ca}(2+)/\text{calmodulin}$ -dependent protein kinase kinase. *J Biol Chem* 277: 15813–15818.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M201075200>
15. *Mao LM, Jin DZ, Xue B, Chu XP, Wang JQ* (2014) Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by CaMKII. *Sheng Li Xue Bao* 66: 365–372.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4435801/>
16. *Wang ZW* (2008) Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol* 38: 153–166.
<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8039-7>
17. *Wu XS, McNeil BD, Xu J, Fan J, Xue L, Melicoff E, Adachi R, Bai L, Wu LG* (2009) $\text{Ca}^{(2+)}$ and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat Neurosci* 12: 1003–1010.
<https://doi.org/10.1038/nn.2355>
18. *Randic M, Padjen A* (1967) Effect of calcium ions on the release of acetylcholine from the cerebral cortex. *Nature* 215: 990.
<https://doi.org/10.1038/215990a0>
19. *Simpson LL* (1968) The role of calcium in neurohumoral and neurohormonal extrusion processes. *J Pharm Pharmacol* 20: 889–910.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09672.x>
20. *Tan TC, Valova VA, Malladi CS, Graham ME, Berven LA, Jupp OJ, Hansra G, McClure SJ, Sarcevic B, Boadle RA, Larsen MR, Cousin MA, Robinson PJ* (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol* 5: 701–710.
<https://doi.org/10.1038/ncb1020>
21. *Cousin MA, Tan TC, Robinson PJ* (2001) Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the dephosphins dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *J Neurochem* 76: 105–116.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00049.x>

22. Marra V, Burden JJ, Thorpe JR, Smith IT, Smith SL, Häusser M, Branco T, Staras K (2012) A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses. *Neuron* 76: 579–589.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.042>
23. Kuromi H, Yoshihara M, Kidokoro Y (1997) An inhibitory role of calcineurin in endocytosis of synaptic vesicles at nerve terminals of *Drosophila* larvae. *Neurosci Res* 27: 101–113.
[https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(96\)01132-7](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(96)01132-7)
24. Igarashi M, Watanabe M (2007) Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca²⁺ concentrations. *Neurosci Res* 58: 226–233.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.03.005>
25. Sakaba T, Neher E (2001) Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron* 32: 1119–1131.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00543-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00543-8)
26. Xue R, Meng H, Yin J, Xia J, Hu Z, Liu H (2021) The Role of Calmodulin vs. Synaptotagmin in Exocytosis. *Front Mol Neurosci* 14: 691363.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.691363>
27. Wang ZW (2008) Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol*. 38: 153–166.
<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8039-7>

Participation of Ca²⁺-Acceptor Proteins in the Mechanisms of the Exo-Endocytic Cycle of Synaptic Vesicles in the Motor Nerve Endings of the Somatic Musculature of the Earthworm *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin^{a, b, #}, N. D. Almazov^b, and E. M. Volkov^{b, ##}

^aKazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russia

^bKazan State Medical University, Kazan, Russia

[#]e-mail: lenizn@yandex.ru

^{##}e-mail: euroworm@mail.ru

Using fluorescence microscopy, we studied the participation of Ca²⁺-acceptor proteins in the processes of the exo-endocytotic cycle of neurotransmitter quantal secretion in the neuromuscular junction of the somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Inhibition of calcineurin, calmodulin and Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinases led to an increase in the process of endocytosis. Blocking the phosphorylation of synaptic proteins enhances the process of endocytosis, causes an increase in the size of the total vesicular pool and accelerates the turnover of synaptic vesicles. It can be concluded that calcium modulation of vesicle exo-endocytosis at the synapses of the evolutionarily primary somatic muscles of annelids occurs with the participation of calcineurin, calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases.

Key words: Ca²⁺-sensor proteins, neuromuscular junction, somatic muscle cells, earthworm

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЫЗВАННАЯ СИНХРОНИЗАЦИЯ ТЕТА-РИТМА ЭЭГ ПРИ ПОДГОТОВКЕ
САККАД И АНТИСАККАД ПО ПАМЯТИ В НОРМЕ И У БОЛЬНЫХ
С КЛИНИЧЕСКИ ВЫСОКИМ РИСКОМ ШИЗОФРЕНИИ**

© 2024 г. А. В. Павлов^{1,*}, М. В. Славуцкая^{1,2}, М. А. Омельченко², А. В. Котенев¹,
И. С. Лебедева²

*¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия*

*²Научный центр психического здоровья, Москва, Россия
E-mail: alexandersun121@gmail.com

Поступила в редакцию 19.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принята к публикации 02.09.2024 г.

Одним из информативных и широко применяемых подходов к пониманию патогенетических (в том числе нейробиологических) механизмов шизофрении являются исследования пациентов с клинически высоким риском (КВР) заболевания. В группах из 20 здоровых испытуемых и 20 больных с КВР изучали выраженность и топографию вызванной синхронизации (ВС) тета-ритма ЭЭГ, связанной с включением периферического стимула, который надо запомнить (парадигма «саккады/антисаккады по памяти»). Анализ ВС проводили по методике Дж. Фертшеллера. По данным величин латентных периодов саккадических ответов и числа ошибок выявили снижение эффективности выполнения задания у больных с КВР по сравнению со здоровыми испытуемыми. Обнаружены межгрупповые различия в выраженности максимальных пиков и топографии ВС тета-ритма в трех последовательных интервалах периода задержки (по 900 мс) при саккадах вправо и антисаккадах влево. Полученные результаты рассматриваются как отражение аномалий в процессах поддержания рабочей памяти и пространственного внимания у больных с КВР, характеризующиеся определенной межполушарной асимметрией. Выказано предположение о «включении» компенсаторных процессов и «реорганизации» фронто-теменных сетей когнитивного контроля с преимущественной сохранностью правого полушария на ранней стадии развития шизофрении.

Ключевые слова: клинически высокие риски шизофрении, вызванная синхронизация тета-ритма ЭЭГ, когнитивный контроль, память, внимание, парадигма «саккады/антисаккады по памяти»

DOI: 10.31857/S0869813924090125, **EDN:** AJEZQN

ВВЕДЕНИЕ

Проблема физиологических механизмов когнитивной регуляции поведения человека и их нарушений при психической патологии остается одной из центральных в нейро- и психофизиологии на протяжении нескольких десятилетий. Информативной моделью для ее решения служат саккадические движения глаз, которые как неотъем-

лемый компонент зрения участвуют во всех видах адаптивного поведения. Программирование саккадических движений глаз непосредственно включает в себя процессы внимания [1], памяти [2–3], принятия решения и торможение [4].

Одной из методических возможностей изучения мозговых механизмов когнитивной регуляции и их нарушений при психической патологии может служить экспериментальная парадигма «саккады по памяти» (memory-guided saccade) [5] и ее модифицированные варианты, включающие как саккады, так и антисаккады по памяти. Для генерации саккадических ответов по памяти необходимо поддержание координат цели в рабочей памяти до сигнала совершить саккаду, а также торможение рефлекторного ответа при произвольном программировании движения глаз к запомненной цели. Парадигма «саккады по памяти» также дает возможность исследовать процессы внимания, которые принимают непосредственное участие в сенсорной переработке, кодировании, хранении и извлечении информации из рабочей памяти [6]. Последнее крайне значимо при исследованиях механизмов патогенеза шизофрении, так как известно, что при этом заболевании затруднено выполнения задач с нагрузкой на память, что, как предполагается, обусловлено ослаблением активации префронтальной коры и ее связей с гиппокампом [7].

Механизмы подготовки саккадических движений глаз и их нарушения при психической патологии находят отражение в параметрах и топографии, связанных с событием потенциалов головного мозга [8]. И здесь одним из нейробиологических коррелятов может служить вызванная синхронизация ритмов ЭЭГ, выраженность которых отражает модификацию функционального состояния нейронных сетей, участвующих в реализации когнитивных функций [9, 10]. Установлено, что при шизофрении когнитивные нарушения сопровождаются ослаблением ВС всех ритмов ЭЭГ [11], хотя ряд авторов указывает на большую информативность для исследования функций рабочей памяти и внимания вызванной синхронизации (ВС) в тета-диапазоне: в их работе было показано усиление тета-синхронизации в префронтальной коре в процессе кодирования зрительной информации в рабочую память у психически здоровых испытуемых и ее ослабление при шизофрении [12].

Особую актуальность для понимания патогенеза шизофрении имеют исследования нарушения когнитивного контроля на ранних (доманифестных) стадиях заболевания при так называемом «клинически высоком риске (КВР) развития шизофрении». Следует отметить, что при наличии исследований саккадических/антисаккадических движений глаз при КВР [13, 14], а также единичных исследований с использованием парадигмы «саккады по памяти» [15] работ с анализом вызванной активности тета-ритма ЭЭГ в доступной литературе (на ресурсах Pubmed, Google scholar, elibrary) найдено не было.

Как следствие, целью настоящей работы стало выявление выраженности и динамики ВС тета-ритма в период задержки в парадигме «саккады-антисаккады по памяти» (рассматривая данный нейрофизиологический феномен как возможный маркер особенностей когнитивных процессов внимания и памяти) у больных с КВР манифестации шизофрении.

Мы предполагаем, что выявленные ЭЭГ паттерны могут быть значимыми с точки зрения поиска потенциальных возможностей ранней диагностики заболевания, прогноза развития шизофрении и выбора адекватного лечения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытуемые

В исследовании приняли участие 20 здоровых мужчин в возрасте 20 ± 2 лет и 20 мужчин в возрасте 19 ± 2 лет из группы КВР развития шизофрении.

Все участники имели нормальное или скорректированное зрение, преимущественно правый профиль асимметрии с ведущей правой рукой. В анамнезе всех испытуемых не отмечено выраженных соматических и неврологических заболеваний, а также зависимостей любой природы (кроме табакокурения).

Больные были впервые госпитализированы в Научный центр психического здоровья по поводу депрессивного состояния (МКБ-10: F32.1, F32.2, F32.38, F32.8). Критериями отбора в группу КВР являлись: юношеский возраст (17–25 лет), первый депрессивный эпизод общей продолжительностью не более 5 лет с уровнем преморбидного функционирования, соответствующим юношескому возрасту на основании социально-учебных характеристик больных, а также наличие в структуре депрессивного состояния аттенуированных позитивных симптомов (АПС), соответствующих критериям аттенуированного психотического синдрома (DSM-5) и адаптированных для клинического материала настоящего исследования [16]. Степень выраженности АПС должна была быть, с одной стороны, достаточной для проведения их клинического распознавания, а с другой стороны, не удовлетворяющей критериям полноценных, развернутых симптомов, позволяющих верифицировать текущий шизофренический процесс (рубрики F20-F29). Количественный критерий отбора включал психометрическое обследование по шкале продромальных симптомов (Scale of Prodromal Symptoms, SOPS) при наличии 3 и более баллов по крайней мере по одному из пунктов подшкалы позитивных симптомов шкалы. К критериям не включения относились: наличие анамнестических данных о нарушениях психического развития, ранее перенесенных психотических приступах.

Всем больным назначалась психофармакотерапия, ведущим фармакологическим классом явились антидепрессанты со средними суточными дозами при пересчете на флуоксетиновый эквивалент 38.9 ± 24.6 мг. В связи с отнесением пациентов к группе КВР назначались антипсихотические препараты со средними суточными дозами в хлорпромазиновом эквиваленте 291.3 ± 21.1 мг.

Нейрофизиологическое обследование проводилось однократно (у больных – перед выпиской из стационара).

Оборудование

Электроэнцефалограмму (ЭЭГ) регистрировали на аппаратно-программном комплексе NVX-52 (Россия) монополярно от 25 отведений (FP1/2, F7/8, F3/4, Fz, FC3/4, FCz, C3/4, Cz, T3/4, T5/6, CP3/4, CPz, P3/4, Pz, O1/2) по схеме 10–10 с помощью фиксирующей шапочки «MCScap-E», модифицированной для 32 электродов. В качестве референтного отведения использовали комбинированный ушной электрод. Горизонтальные движения глаз (влево – вправо) регистрировали биполярно с помощью электроокулограммы (ЭОГ). Два чашечковых неполяризуемых электрода диаметром 10 мм располагали у наружного края правой и левой глазниц. Соппротивление под электродами не превышало 5 кОм. Частота оцифровки сигнала 512 Гц; ФВЧ 70 Гц, постоянная времени для записи ЭЭГ 1 с, для ЭОГ 0.5 с.

Процедура

Во время исследования испытуемый находился в затемненном помещении, сидя в кресле с подголовником. Зрительные стимулы диаметром 0.2 угловых градуса предъявляли на темном экране монитора, расположенном на расстоянии 60 см от глаз испытуемого.

Использовали модифицированный вариант парадигмы «саккады по памяти» с добавлением антисаккадических ответов на запомненные стимулы.

Каждому участнику в неопределенном порядке с вероятностью 50% предъявляли в центре экрана один из двух типов фиксационных стимулов (ЦФС) в виде крестика или кружка, сигнализирующих о характере будущего ответа: движение глаз на запомненный стимул (саккада) или в противоположную (симметричную) точку пространства (антисаккада). Применяли метод контрбалансировки: у половины участников сигналом совершать саккаду был кружок, а в противоположную сторону (антисаккаду) – крестик. У второй половины участников, наоборот, крестик был сигналом совершить саккаду, а кружок – антисаккаду. Интервал между последующими реализациями стимулов составлял 2–3 с.

Испытуемым давалась инструкция: «Фиксируйте взор на центральном стимуле (ЦФС). При включении периферического стимула (ПС) слева или справа необходимо продолжать удерживать взгляд на центральном стимуле и запомнить локализацию периферического стимула. После выключения центрального стимула в виде кружка Вы должны как можно быстрее перевести взгляд на запомненную цель, а если центральный стимул был в виде крестика, то после выключения центрального стимула Вам надо как можно быстрее перевести взор в противоположную (симметричную) относительно стимула точку пространства. При повторном предъявлении периферического стимула переведите на него взор, после чего верните взгляд в центр экрана».

Схема предъявления стимулов представлена на рис. 1.

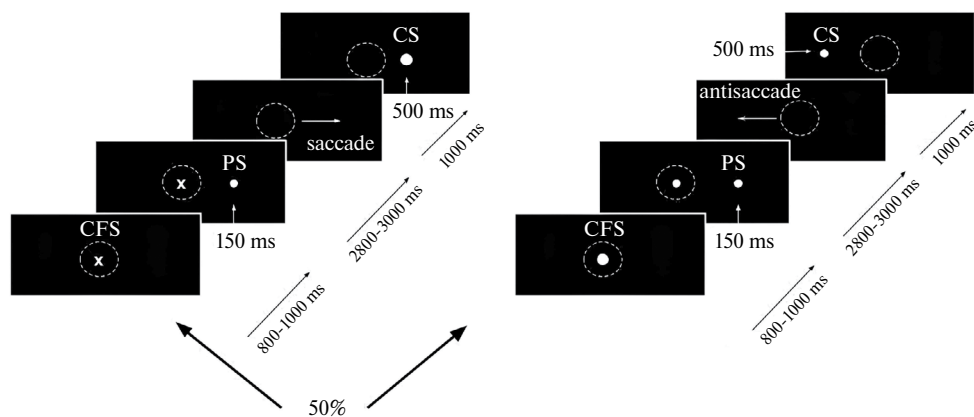


Рис. 1. Схема предъявления стимулов в парадигме «саккады/антисаккады по памяти». Условные обозначения: CFS – центральный фиксационный стимул, PS – периферический стимул, CS – коррекционный стимул.

Периферический стимул (ПС) длительностью 150 мс предъявляли слева или справа на расстоянии 7 угловых градусов от ЦФС через 800–1000 мс после его «включения». ПС предъявляли с равной вероятностью в левом или правом зрительном полуполе. Испытуемый должен был запомнить локализацию ПС, не переводя на него взор.

Через 2800–3000 мс после включения ПС (период задержки) ЦФС выключали, что служило сигналом совершить движение глаз в соответствии с инструкцией (саккаду или антисаккаду). Через 1000 мс после выключения ЦФС предъявляли ПС в позиции, соответствующей цели саккадического ответа (КС – коррекционный стимул). Предъявление КС необходимо для определения точности и правильности движения глаз по памяти.

Стимулы предъявляли блоками по 50 стимулов в каждом. Количество стимулов зависело от скорости зрительного утомления субъекта. Между блоками стимулов участникам предоставляли возможность отдыха. Исследованию предшествовало обучение субъектов не совершать саккады на ПС, в течение которого предъявляли от 1 до 3 стимульных блоков. В течение обследования каждому участнику предъявляли от 350 до 450 реализаций зрительных стимулов.

Анализ данных

Планирование и управление исследованием, сбор и первичный анализ данных проводили средствами комплексной электрофизиологической лаборатории CONAN-NVX (Россия). Поиск саккад, вычисление величины их латентного периода (ЛП), усреднение ЭЭГ-записей и их анализ осуществляли автоматически с помощью системы

CONAN-m и оригинальных компьютерных программ SACCADE SEACH и CONAN GLEW. Начало саккады определяли как момент первой из трех последовательных точек отклонения кривой ЭОГ от нулевой линии. Для анализа использовали только те записи ЭЭГ, в которых ЛП саккадического ответа варьировал в диапазоне 85–600 мс у здоровых испытуемых и 85–800 мс у больных. Саккадические движения глаз, возникающие до момента выключения ЦФС рассматривались как ошибочные опережающие ответы. Подсчитывалось также число ошибочных саккад неправильного направления, а также число отсутствующих саккадических ответов.

Вызванную синхронизацию тета-ритма ЭЭГ в период задержки анализировали по методике Pfurtscheller и Lopes da Silva [9] с помощью специализированного программного блока ERS системы CONAN-m. Записи ЭЭГ подвергали цифровой фильтрации в частотном диапазоне тета-ритма (4–7 Гц), а затем усредняли от момента включения ПС. Уровень ВС тета-ритма вычислялся в процентах по формуле $BC\% = (A(i) - R) / R \times 100$, где $A(i)$ мощность тета-ритма в каждой временной точке интервала между включением ПС и выключением ЦФС (2700 мс), а R – средняя мощность тета-ритма в референсном периоде (500 мс) записи ЭЭГ до включения ПС.

В исследуемом интервале межстимульной паузы (период задержки) выделяли индивидуальные значения максимального пика ВС тета-ритма в соответствующем отведении ЭЭГ в трех последовательных временных отрезках по 900 мс (1-й интервал 0–900 мс; 2-й интервал 900–1800 мс, 3-й интервал 1800–2700 мс).

Использовали метод выборочного усреднения ЭЭГ [17]. Усредняли только те записи ЭЭГ, в которых величина ЛП саккадического ответа варьировала в узком диапазоне от среднего значения или главной моды в распределении ЛП саккадических ответов (± 20 –30 мс у здоровых испытуемых и ± 30 –50 мс у больных). Подобный метод усреднения необходим из-за широкого диапазона колебаний величины ЛП саккад (от 80 до 600 мс в норме и до 800 мс у больных с КВР) и дает возможность определить уровень мощности ВС тета-ритма при оптимальном для каждого субъекта уровне внимания и функционального состояния. В зависимости от субъекта число записей ЭЭГ, удовлетворяющих выбранным критериям усреднения, колебалось от 25 до 30.

Записи ЭЭГ, в которых ЛП саккадических ответов был меньше 80 мс и больше 600 мс у здоровых испытуемых и 800 мс у больных, а также записи ЭЭГ с артефактами от движения глаз исключались из обработки. В зависимости от субъекта число записей, оставшихся для обработки данных, варьировало от 250 до 400, межгрупповых различий в числе записей ЭЭГ, выбранных для обработки, установлено не было. В период задержки применяли также программный метод локального удаления артефактов от морганий.

В связи с большими индивидуальными различиями в локализации пиков ВС тета-ритма для каждого интервала delay-периода проводили межгрупповое сравнение долей числа пиков ВС тета-ритма в передних (F3, F4, Fz, FC3, FC4, FCz, C3, C4, Cz, T3, T4) и в задних (CP3, CP4, CPz, P3, P4, Pz, T5, T6, O1 и O2) отведениях ЭЭГ.

Статистический анализ данных проводили с использованием программ MS Excel и STADIA 8.0. Достоверность различий средних значений величины ЛП саккады и числа ошибочных саккадических ответов вычисляли с помощью непараметрического двухвыборочного критерия Вилкоксона (W). Для оценки межгрупповых различий в величине максимальных пиков ВС тета-ритма использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA для модели фиксированных факторных эффектов с повторными измерениями. Первый фактор – группа (2 уровня – больные и здоровые), второй вспомогательный фактор – отведение (19 уровней). Анализ проводили отдельно для 3 сочетаний: «условие» (2 уровня – саккады и антисаккады), «латеральность» (2 уровня – саккада влево или вправо) и «интервал» (3 уровня – первый, второй, третий). Для коррекции множественных сравнений применяли поправку Бонферрони. Различия в частотах событий оценивали по Z-критерию согласия частот.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поведенческие данные

Анализ поведенческих данных выявил межгрупповые различия в количестве ошибочных ответов и величине латентного периода саккад и антисаккад по памяти. В обеих группах встречались ошибки в виде саккадических ответов, опережающих выключение ЦФС, а также ошибки направления или отсутствие ответа.

Обнаружено увеличение числа ошибок в группе больных по сравнению со здоровыми испытуемыми независимо от характера саккадического ответа: для саккад по памяти влево – $25 \pm 2\%$ у больных и $5 \pm 4\%$ у здоровых ($W = 0.54, p < 0.001$), а для саккад вправо – $18 \pm 1\%$ у больных и $5 \pm 6\%$ у здоровых ($W = 0.34, p < 0.001$). Для антисаккад по памяти число ошибок в группах было соответственно: $29 \pm 4\%$ и $7 \pm 7\%$ для антисаккад влево ($W = 2.01, p < 0.001$); $17 \pm 2\%$ и $6 \pm 7\%$ для антисаккад вправо ($W = 0.34, p < 0.001$).

Показаны достоверно большие ЛП саккад и антисаккад по памяти у больных с КВР по сравнению с группой нормы независимо от направления ответа: для саккад влево на 36.6 ± 1 мс ($W = 0.001, p < 0.001$), вправо на 27 ± 1 мс ($W = 0.33, p < 0.001$) (рис. 2). В группе здоровых испытуемых обнаружены латеральные различия в виде меньших ЛП саккад и антисаккад по памяти влево по сравнению с ответами вправо на 10 ± 2 мс ($W = 3.04, p < 0.002$) и 11 ± 2 мс ($W = 3.3, p < 0.001$) соответственно. В группе больных латеральных различий в величине ЛП не обнаружено.

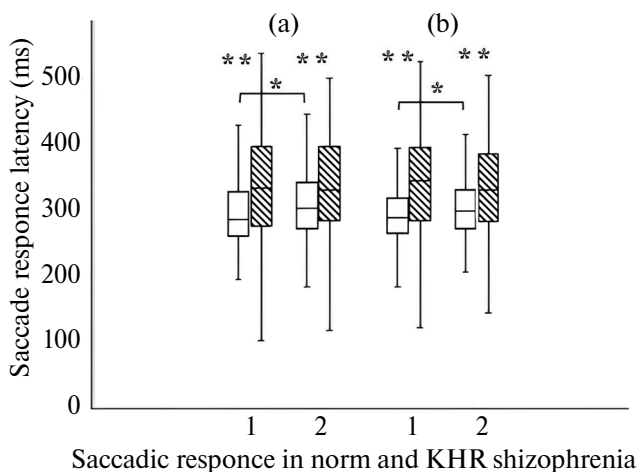


Рис 2. Диаграмма величины латентного периода саккад (а) и антисаккад (б) по памяти в группах здоровых и больных с КВР.

Условные обозначения: светлые прямоугольники – здоровые испытуемые, заштрихованные прямоугольники – больные с КВР. На оси абсцисс: 1 – саккадические ответы влево, 2 – саккадические ответы вправо. Звездочки означают достоверность различий средних значений: * с вероятностью $p \leq 0.01$, ** с вероятностью $p \leq 0.001$.

Данные ЭЭГ

Анализ полученных данных выявил как внутригрупповые, так и межгрупповые различия в средней мощности пиков ВС тета-диапазона в зависимости от характера и направления саккадического ответа, а также интервала межстимульной паузы (табл. 1).

Дисперсионный анализ выявил влияние фактора «группа» на выраженность ВС тета-ритма в зависимости от характера саккадического ответа, его направления и интервала периода задержки.

Таблица 1. Величина пиков ВС тета-ритма ($M \pm SEM$, %) в трех последовательных интервалах периода задержки перед саккадами и антисаккадами по памяти у здоровых испытуемых и у больных с КВР

Интервал периода задержки (мс)	Здоровые				Больные			
	саккады		антисаккады		саккады		антисаккады	
	влево	вправо	влево	вправо	влево	вправо	влево	вправо
0–900	11 ± 2**	16 ± 2**	16 ± 2**	13 ± 3	16 ± 3**	9 ± 2**	11 ± 2**	11 ± 2
900–1800	14 ± 2	12 ± 4	9 ± 2**	9 ± 1	17 ± 3	14 ± 2	14 ± 2**	9 ± 2
1800–2700	12 ± 2	9 ± 1**	11 ± 1	10 ± 1	16 ± 3	15 ± 2**	14 ± 2	13 ± 2

Данные представлены как среднее значение мощности пика ВС тета-ритма и стандартной ошибки средней величины. Звездочки после цифр обозначают достоверные межгрупповые различия. * – достоверность различий средних значений с вероятностью $p \leq 0.01$, ** – достоверность различий средних значений с вероятностью $p \leq 0.001$.

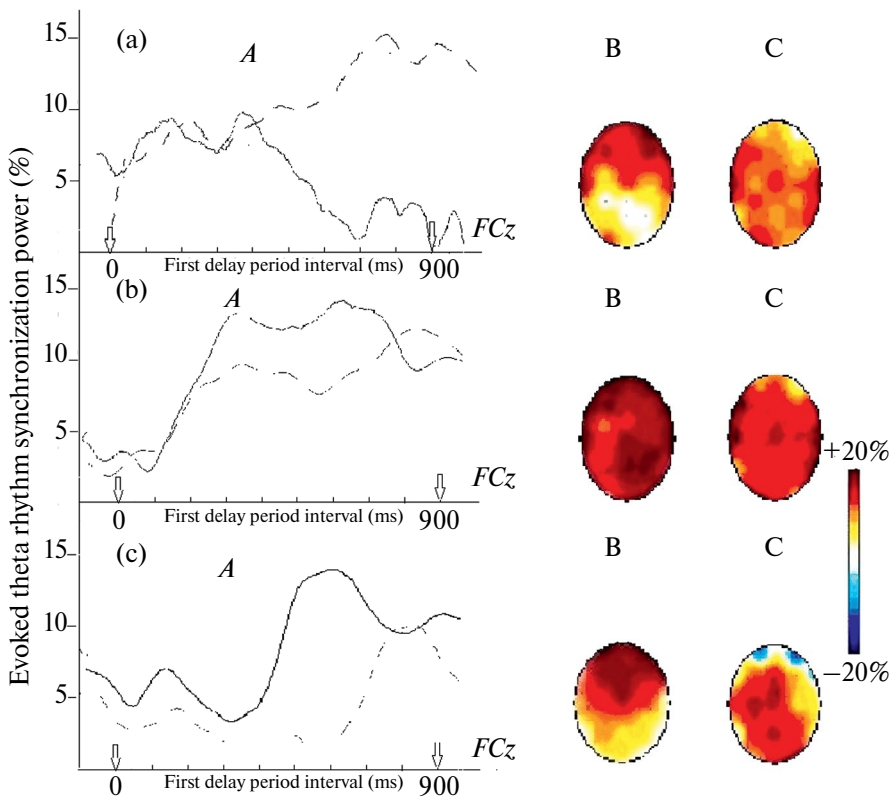


Рис. 3. Кривые уровня мощности ВС тета-ритма (А) и карты распределения мощности максимального пика ВС тета-ритма по отведениям ЭЭГ (В, С) в первом интервале периода задержки перед саккадами влево (а), саккадами вправо (б) и антисаккадами влево (с). Условные обозначения: (А) – сплошная линия – группа нормы, пунктирная линия – группа больных; (В) – группа нормы; (С) – группа больных КВР. Красный цвет – вызванная синхронизация тета-ритма, синий – вызванная десинхронизация тета-ритма.

В первом интервале перед саккадами по памяти влево выраженность пиков ВС тета-ритма была выше у больных, чем у здоровых испытуемых ($F_{(2,19)} = 15.7; p < 0.001$). При этом пики ВС тета-ритма у здоровых преобладали во фронто-центрально-височных отведениях (13 против 7, $Z = -2.214, p < 0.02$), а у больных обнаружено их равномерное распределение в передних и задних отведениях при $p > 0.05$ (рис. 3а).

В отличие от саккад по памяти влево перед саккадами по памяти вправо выраженность пиков ВС тета-ритма была выше у здоровых испытуемых по сравнению с больными ($F_{(2,19)} = 12.7; p < 0.001$). При этом как у здоровых, так и у больных наблюдалась равновероятностная представленность пиков ВС тета-ритма как в передних, так и задних отведениях ЭЭГ ($p > 0.05$), рис 3б.

Так же как и для саккад вправо выраженность пиков ВС тета-ритма для антисаккад влево в первом интервале была выше у здоровых испытуемых по сравнению с пациентами ($F_{(2,19)} = 3.03, p < 0.001$). При этом пики ВС тета-ритма у здоровых испытуемых преобладали во фронто-центрально-височных отведениях (14 против 6, $Z = -2.846, p < 0.001$), а у пациентов были диффузно расположены по отведениям ($p > 0.05$), рис 3б.

Во втором интервале межгрупповые различия в уровне мощности пиков ВС тета-ритма наблюдались только перед антисаккадами по памяти влево. Выраженность пиков ВС тета-ритма была выше у больных с КВР по сравнению с нормой ($F_{(2,19)} = 3.38; p < 0.001$). При этом в группе больных пики ВС тета-ритма преобладали в передних фронто-центральных и верхне-височных отведениях (13 против 7, $Z = -2.214, p < 0.05$), а у здоровых были диффузно локализованы, рис. 4а.

В третьем интервале межгрупповые различия были обнаружены только для саккад по памяти вправо: выраженность пика ВС тета-ритма была больше у больных с КВР по сравнению с нормой ($F_{(2,19)} = 3.34; p < 0.001$), в обеих группах наблюдалась равновероятностная представленность пиков ВС тета-ритма как в передних, так и задних отведениях ЭЭГ ($p > 0.05$), рис. 4б.

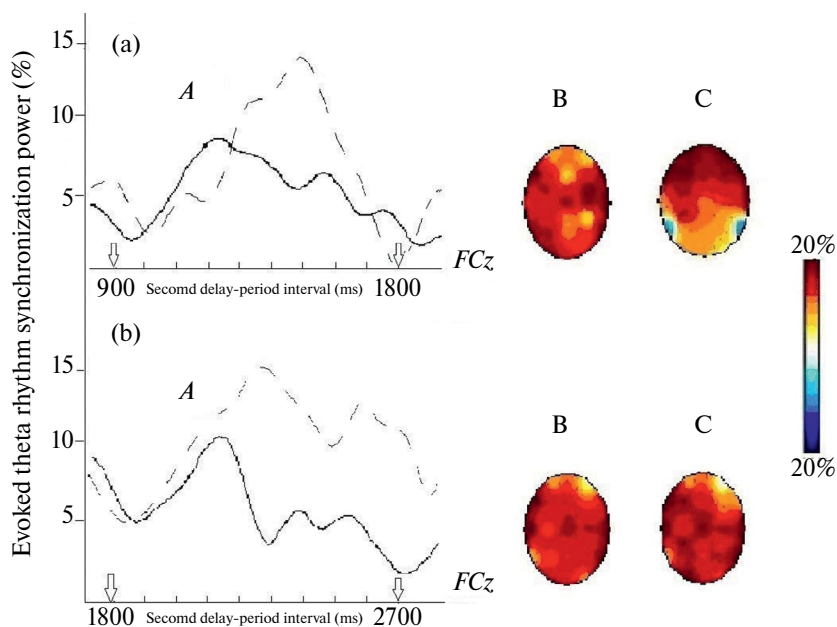


Рис. 4. Кривые уровня мощности ВС тета-ритма и карты распределения мощности максимального пика ВС тета-ритма по отведениям ЭЭГ во втором интервале периода задержки перед антисаккадами влево (а) и в третьем интервале перед саккадами вправо (б). Условные обозначения как на рис. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, анализ поведенческих и ЭЭГ данных выявил определенные различия между больными с КВР шизофрении и здоровыми испытуемыми в парадигме «саккады/антисаккады по памяти».

Показано, что эффективность выполнения задачи у больных была существенно снижена по сравнению со здоровыми испытуемыми, что проявлялось в увеличении числа ошибочных ответов и величины ЛП саккад и антисаккад по памяти.

Увеличение ЛП саккадических ответов по памяти у больных с КВР шизофрении также может быть обусловлено нарушениями сенсорной переработки и ухудшением удержания в памяти инструкции к задаче, которые также известны при шизофрении [18–19].

Получены интересные данные об отсутствии латеральных различий в величине ЛП саккадических ответов по памяти в группе больных с КВР, тогда как у здоровых испытуемых показано уменьшение величины ЛП саккад и антисаккад влево по сравнению с ответами вправо. Аналогичные данные были показаны ранее при шизофрении в саккадических парадигмах «Gap» и «Overlap» [20].

Подобная асимметрия величины ЛП саккадических ответов у здоровых испытуемых может быть ассоциирована с активацией правого полушария, доминирующего в процессах внимания, памяти и торможения при генерации движений глаз влево [21–23]. Отсутствие латеральных различий в величине ЛП саккадических ответов по памяти у больных с КВР может указывать на ослабление когнитивного контроля выполнения произвольных саккадических ответов на ранней стадии шизофрении.

В обеих группах было обнаружено отсутствие различий между величиной ЛП саккад и антисаккад по памяти, тогда как на зрительные стимулы ЛП антисаккад больше по сравнению с саккадами [24–26]. Предполагается, что увеличение ЛП антисаккады на зрительный стимул обусловлено дополнительным включением в ее подготовку процессов переориентации внимания, а также торможения произвольных саккад на ПС, что является нелегкой задачей для испытуемых и требует предварительной тренировки. Отсутствие различий в величине ЛП саккады и антисаккады в парадигме «саккады/антисаккады по памяти» в обеих группах позволяет предположить, что подготовка саккадических ответов в парадигме «саккады/антисаккады по памяти» происходит в период задержки до выключения ЦФС.

Парадигма «саккады/антисаккады по памяти» позволяет детально исследовать активационные процессы в коре мозга на последовательных этапах хранения информации в рабочей памяти в межстимульном периоде. С этой целью задержку между предъявлением ПС и выключением ЦФС условно подразделяют на три интервала, которые, как предполагается, несут различную функциональную нагрузку [27–28]. В первом интервале преобладают процессы анализа стимульной информации, ее кодирования и «записи» в рабочую память, включая представление цели, оценку значимости стимула и «правила» реализации ответа в соответствии с инструкцией. Во втором интервале происходят процессы удержания информации в рабочей памяти, а в третьем интервале – процессы подготовки к совершению ответного действия. Все этапы межстимульного периода сопровождаются вовлечением разных форм избирательного внимания, включая перцептивное, пространственное, установочное (поддерживающее), моторное и предиктивное [29–32].

В каждом из интервалов периода задержки нами были выявлены межгрупповые различия в выраженности вызванной тета-синхронизации, которые могут отражать различные уровни активации нейронных сетей, участвующих в реализации функций рабочей памяти и внимания.

Во многих исследованиях показано, что снижение эффективности деятельности при шизофрении коррелирует со снижением уровня вызванной тета-синхронизации,

что интерпретировалось как ухудшение когнитивного контроля и рабочей памяти, в частности [12, 33]. Однако эти данные были получены на больных с хронической шизофренией. В нашем исследовании у больных с КВР шизофрении в большинстве случаев не обнаружено снижения вызванной тета-синхронизации, однако выявлены отдельные межгрупповые различия, зависящие от направления саккадического ответа, его характера и интервала задержки. При этом в ряде случаев выраженность ВС тета-ритма у больных с КВР шизофрении была выше, чем у здоровых испытуемых (при саккадах влево – в первом интервале, при антисаккадах влево – во втором интервале и при саккадах вправо – в третьем интервале, табл. 1).

Снижение ВС тета-ритма у больных было показано только для саккад вправо и антисаккад влево в первом интервале. Эти межгрупповые различия можно ассоциировать с предполагаемой дисфункцией нейронных сетей левого полушария, что может приводить к ухудшению сенсорной переработки, кодирования и «записи» информации в рабочую память. Саккады вправо и антисаккады влево генерируются на запомненные стимулы в правом полушарии, которые проецируются в контралатеральное левое полушарие. В литературе достаточно часто обсуждается левополушарный дефицит для ряда структурно-функциональных показателей головного мозга при шизофрении (например, [34, 35]), а также в группе КВР [36, 37], однако точные механизмы сопряжения найденных нами особенностей с нарушениями сенсорного восприятия, внимания станут предметом дальнейших наших исследований.

Пока можно отметить, что межгрупповые различия в распределении пиков мощности ВС тета-диапазона по отведениям отчасти подтверждают наше предположение о связи левополушарных аномалий с выраженностью ВС тета-ритма при КВР. У здоровых испытуемых пики максимальной мощности ВС тета-ритма перед саккадами вправо в первом интервале преобладали в передних отведениях, что отражает активацию нейронных сетей префронтальной коры [38–39]. Снижение уровня ВС тета-ритма в группе больных с КВР по сравнению с группой здоровых в аналогичных условиях сопровождается диффузным расположением пиков мощности ВС тета-ритма по отведениям, что может быть обусловлено дополнительной активацией теменно-затылочных и нижневисочных нейронных сетей коры и может иметь компенсаторное значение. В литературе существуют данные о включении дополнительных теменно-затылочных «генераторов» тета-ритма для компенсации нарушений исполнительных функций префронтальной коры у больных с первым эпизодом шизофрении [40].

В первом интервале перед саккадами влево у больных с КВР, наоборот, показано усиление вызванной тета-синхронизации по сравнению со здоровыми испытуемыми, при этом пики максимальной ВС тета-ритма преимущественно локализовались в передних фронто-центрально-височных отведениях. Эти факты могут отражать состояние сохранности/гиперкомпенсации активности нейронных сетей префронтальной коры шизофрении на этапе восприятия и кодирования информации в память, за которые преимущественно отвечает правое полушарие.

Во втором интервале межгрупповые различия в уровне вызванной тета-синхронизации наблюдались только при антисаккадах влево, при этом она была выше у больных с КВР по сравнению с нормой. Подготовка антисаккады по памяти как более сложного движения по сравнению с саккадой требует дополнительных процессов «перекартирования» пространственного вектора движения. Имеются данные о том, что в период задержки зрительная информация хранится в контралатеральном к позиции стимула полушарии [41, 42], то есть за хранение и трансформацию информации при антисаккадах по памяти влево отвечает левое полушарие, нарушения которого в ранний период шизофрении были указаны выше.

Ранее в парадигмах «саккады по памяти» и «go/no go delay» было показано, что хранение информации в период задержки носит активный характер. Это проявляется в постепенном «перекартировании» положения саккадической цели из ретинотопиче-

ских координат в моторные с использованием информации о текущем положении глаза в орбите. В многочисленных экспериментах на обезьянах был выявлен «нейронный коррелят» этого процесса в виде пространственно-селективной тонической активности сенсорных и моторных нейронов различных структур мозга в период задержки (префронтальной коры, зоны LIP теменной коры, черной субстанции (SNpr) и верхнего двухолмия) [5, 43].

Исходя из имеющихся сведений, можно предположить, что увеличение тета-синхронизации в передних отведениях у больных с КВР во втором интервале при антисаккадах влево отражает дополнительную активацию нейронных сетей префронтальной коры как ведущей в поддержании информации в рабочей памяти в сложных условиях.

Диффузная локализация пиков мощности ВС тета-диапазона у здоровых испытуемых на этом этапе задержки при антисаккадах влево может ассоциироваться с включением процессов установочного (sustained) внимания, избирательно поддерживающего активацию пространственной репрезентации стимула и моторного «плана» антисаккады, которое контролируется соответствующими сетями коры [44].

В третьем интервале обнаружено увеличение уровня тета-синхронизации для саккад вправо у больных с КВР по сравнению с нормой. При этом в обеих группах пики мощности ВС тета-диапазона располагались диффузно по отведениям. Как предполагают, третий интервал сопровождается активацией нейронных сетей, ассоциированных с процессами «извлечения» информации из рабочей памяти и предварительным программированием саккадического ответа в соответствии с инструкцией [27, 28]. Усиление выраженности ВС тета-диапазона у больных с КВР перед саккадами вправо может отражать дополнительную (компенсаторную) активацию сетей когнитивного контроля на заключительном этапе формирования двигательной программы саккадического ответа по памяти в условиях дефицита предиктивных процессов направленного внимания и проактивного торможения, показанных ранее у больных шизофренией [45].

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одним из факторов, который потенциально может влиять на результаты, является проводимая фармакотерапия – в литературе описано влияние психотропных препаратов на саккадические движения глаз в тесте «саккады по памяти» [46], хотя влияние на латентность авторами выявлено не было. Очевидным направлением дальнейших исследований является также увеличение объема выборок, а также анализ ВС не только в тета-, но и в других поддиапазонах ЭЭГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование выявило межгрупповые различия в выраженности вызванной тета-синхронизации в каждом из интервалов периода задержки, которые могут отражать уровни активации нейронных сетей, участвующих в реализации различных когнитивных функций.

Результаты исследования позволяют предполагать, что снижение эффективности выполнения задачи у больных с КВР может быть обусловлено ухудшением функций сенсорного восприятия (первый интервал), процессов удержания информации в памяти и установочного внимания (второй интервал), а также предиктивного внимания и проактивного торможения (третий интервал).

Выявленная асимметрия в выраженности ВС тета-ритма в зависимости от направления саккадического ответа может быть ассоциирована с дисфункцией нейронных сетей левого полушария, известной при КВР шизофрении. Случаи увеличения ВС тета-ритма у больных с КВР по сравнению со здоровыми испытуемыми и преобладание ее пиков в передних отведениях может отражать компенсаторные процессы дополни-

тельной активации нейронных сетей префронтальной коры на доманифестном этапе шизофрении, хотя клиническую значимость этого нейрофизиологического феномена еще предстоит выяснить.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (П. А. В., С. М. В.), сбор данных (П. А. В., О. М. А., К. А. В.), обработка данных (П. А. В., К. А. В.), интерпретация полученных результатов (П. А. В., С. М. В., О. М. А., Л. И. С.), написание и редактирование манускрипта (П. А. В., С. М. В., Л. И. С., О. М. А., К. А. В.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (темы № 121032500081–5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и № 1023032700308–5 Научного центра психического здоровья). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комиссией по этике биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол № 160-д-з от 21.03.2024 г.) и Этическим комитетом Научного центра психического здоровья (№ 15–09 от 16.05.2019 г.).

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rizzolatti G, Riggio L, Dascola I, Umiltà C* (1987) Reorienting attention across the horizontal and vertical meridians: Evidence in favor of a premotor theory of attention. *Neuropsychologia* 25(1): 31–40. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(87\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0028-3932(87)90041-8)
2. *Kastner S, DeSimone K, Konen CS, Szczepanski SM, Weiner KS, Schneider KA* (2007) Topographic Maps in Human Frontal Cortex Revealed in Memory-Guided Saccade and Spatial Working-Memory Tasks. *J Neurophysiol* 97(5): 3494–3507. <https://doi.org/10.1152/jn.00010.2007>
3. *Damiano C, Walther DB* (2019) Distinct roles of eye movements during memory encoding and retrieval. *Cognition* 184: 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2018.12.014>
4. *Ding L, Gold JJ* (2011) Neural Correlates of Perceptual Decision Making before, during, and after Decision Commitment in Monkey Frontal Eye Field. *Cerebral Cortex* 22(5): 1052–1067. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr1>
5. *Hikosaka O, Wurtz RH* (1983) Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. III. Memory-contingent visual and saccade responses. *Neurophysiology* 49(5): 1268–1284. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.49.5.1268>
6. *Offen Sh, Gardner J, Schluppeck D, Heeger D* (2010) Differential roles for frontal eye fields (FEF) and intraparietal sulcus (IPS) in visual working memory and visual attention. *J Vis* 10(11): 28. <https://doi.org/10.1167/10.11.28>
7. *Guo JY, Ragland JD, Cartera CS* (2019) Memory and Cognition in Schizophrenia. *Mol Psychiatry* 24(5): 633–642. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0231-1>

8. *Славуцкая МВ, Моисеева ВВ, Шульговский ВВ* (2008) Внимание и движения глаз. Психофизиологические представления, нейрофизиологические модели и ЭЭГ корреляты. Журн высш нерв деятелън им ИП Павлова 58 (2): 131–150. [*Slavutskaya MV, Moiseeva VV, Shulgovskii VV* (2008) Attention and eye movements. Psychophysiological concepts, neurophysiological models and EEG correlates. Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova. (In Russ)].
9. *Pfurtscheller G, Lopes da Silva FH* (1999) Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. Clin Neurophysiol 110: 1842–1857.
[https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(99)00141-8)
10. *Wang X-J* (2010) Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. Physiol Rev 90(3): 1195–1268.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2008>
11. *Бочкарев ВК, Киренская АВ, Солнцева СВ, Ткаченко АА* (2017) Специфика пространственной организации вызванных ритмов ЭЭГ у пациентов с паранойдной шизофренией. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 117(1): 29–35. [*Bochkarev VK, Kirenskaya AV, Solntseva SV, Tkachenko AA* (2017) Specificity of the spatial organization of evoked EEG rhythms in patients with paranoid schizophrenia. J Neurol Psychiatry SS Korsakov. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17116/jnevro20171171129-35>
12. *Kang SS, MacDonald AW, Chafee MV, Im Ch-H, Bernat EM, Davenport NV, Sponheim SR* (2018) Abnormal cortical neural synchrony during working memory in Schizophrenia. Clin Neurophysiol 129(1): 210–221.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2017.10.024>
13. *Obyedkov I, Skuhareuskaya M, Skugarevsky O, Obyedkov V, Buslauskis P, Skuhareuskaya T, Waszkiewicz N* (2019) Saccadic eye movements in different dimensions of schizophrenia and in clinical high-risk state for psychosis. BMC Psychiatry 19(1): 110.
<https://doi.org/10.1186/s12888-019-2093-8>
14. *Ekin M, Akdal G, Bora E* (2024) Antisaccade error rates in first-episode psychosis, ultra-high risk for psychosis and unaffected relatives of schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. Schizophr Res 266: 41–49.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2024.02.016>
15. *Caldani S, Bucci MP, Lamy JC, Seassau M, Bendjemaa N, Gadel R, Gaillard R, Krebs MO, Amado I* (2017) Saccadic eye movements as markers of schizophrenia spectrum: Exploration in at-risk mental states. Schizophr Res 181: 30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.09.003>
16. *Омельченко МА* (2021) Клинико-психопатологические особенности юношеских депрессий с аттенуированными симптомами шизофренического спектра. Психиатрия 19(1): 16–25. [*Omelchenko MA* (2021) Clinical and psychopathological features of juvenile depression with attenuated symptoms of the schizophrenia spectrum. Psychiatry. (In Russ)].
<https://doi.org/10.30629/2618-6667-2021-19-1-16-25>
17. *Гнездицкий ВВ* (2004) Обратная задача ЭЭГ и клиническая энцефалография (картирование и локализация источников электрической активности мозга). Москва. МЕД пресс-информ. [*Gnezdickii VV* (2004) Inverse EEG problem and clinical encephalography (mapping and localization of sources of electrical activity of the brain). Moscow. MED press-inform. (In Russ)].
18. *Sklar AL, Coffman BA, Salisbury DF* (2020) Localization of early-stage visual processing deficits at schizophrenia spectrum illness onset using magnetoencephalography. Schizophr Bull 46(4): 955–963.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa010>
19. *Luck SJ, Gold JM* (2008) The Construct of Attention in Schizophrenia. Biol Psychiatry 64(1): 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.014>
20. *Evans WJ, Schwartz BD* (1997) Attentional mechanisms of saccadic eye movements in schizophrenia. Neuropsychiatr Neuropsychol Behav Neurol 10(1): 17–24. PMID: 9118193
21. *Awh E, Jonides J* (2001) Overlapping mechanisms of attention and spatial working memory. Trends Cogn Sci 5(3): 119–126.
[https://doi.org/10.1016/s1364-6613\(00\)01593-x](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(00)01593-x)
22. *Corbetta M, Shulman GL* (2002) Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. Nat Rev Neurosci 3(3): 201–215.
<https://doi.org/10.1038/nrn755>
23. *Prime SL, Vesia M, Crawford JD* (2008) Transcranial Magnetic Stimulation over posterior parietal cortex disrupts transsaccadic memory of multiple objects. J Neurosci 8(27): 6938–6949.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0542-08.2008>
24. *Allen JS, Lambert AJ* (1996) Antisaccadic eye movements and attentional asymmetry in schizophrenia in three pacific population. Act Psychiatr Scand 94(4): 258–265.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1996.tb09858.x>

25. *Cletmentz BA, McDowell JE, Stewart SE* (2001) Timing and magnitude of frontal activity differentiates refixation and anti-saccade performance. *Neuroreport* 12(9): 1863–1868.
<https://doi.org/10.1097/00001756-200107030-00020>
26. *Славуцкая МВ, Шульговский ВВ* (2004) Потенциалы головного мозга человека перед антисаккадами. Журн высш нерв деятелън им ИП Павлова 54(3): 320–330. [*Slavutskaya MV, Shulgovskii VV* (2004) The brain potentials before antisaccades in man. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova* 54(3): 320–330. (In Russ)].
27. *Evdokimidis I, Smyrnis N, Constantinidis TS, Gourtzelidis P, Papageorgiou C* (2001) Frontal-parietal activation differences observed before the execution of remembered saccades: an event-related potentials study. *Cognit Brain Res* 12(1): 89–99.
[https://doi.org/10.1016/s0926-6410\(01\)00037-4](https://doi.org/10.1016/s0926-6410(01)00037-4)
28. *Brignani D, Maioli C, Maria Rossini P, Miniussi C* (2007) Event-related power modulations of brain activity preceding visually guided saccades. *Brain Res* 1136(1): 122–131.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.018>
29. *Coull JT* (1998) Neural correlates of attention and arousal insights from elctrophysiology, functional neuroimaging and psychopharmacology. *Progr Neurobiol* 55(4): 343–361.
[https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00011-2](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00011-2)
30. *Posner MJ, DiGirolamo GJ* (2000) Attention in cognitive neuroscience: an overview. The New Cognitive Neurosciences. A Bradford Book. Gazzaniga MS (Ed). The Mit Press. Cambrdge, Massachusetts, London. 623–630.
31. *Tseng Ph, Chang Ch, Chiaou HY, Liang WK, Liu ChL, Hsu TY, Hung DL, Tzeng OJL, Juan ChH* (2013) The dorsal attentional system in oculomotor learning of predictive information. *Front Neurophziol* 2(7): 404.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00404>
32. *Kuo B, Stokes MG, Nobre ACh* (2012) Attention modulates maintenance of representations in visual short-term memory. *J Cogn Neurosci* 24(1): 51–60.
https://doi.org/10.1162/jocn_a_00087. Epub 2011 Jul 7
33. *Uhlhaas PJ, Haenschel C, Nikolic' D, Singer W* (2005) The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophr Bull* 34(5): 927–943.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbn062>
34. *Gur RE, Chin S* (1999) Laterality in functional brain imaging studies of schizophrenia. *Schizophr Bull* 25(1): 141–156.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a033361>
35. *Chahine G, Richter A, Wolie S, Goya-Maldonado R, Gruber O* (2017) Disruptions in the left frontoparietal network underlie resting state endophenotypic markers in schizophrenia. *Human Brain Mapping* 38: 1741–1750.
<https://doi.org/10.1002/hbm.23477>
36. *Tomyshev AS, Lebedeva IS, Akhadov TA, Omelchenko MA, Rumyantsev AO, Kaleda VG* (2019) Alterations in white matter microstructure and cortical thickness in individuals at ultra-high risk of psychosis: A multimodal tractography and surface-based morphometry study. *Psychiatr Res Neuroim* 289: 26–36.
<https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2019.05.002>
37. *Li R-R, Lyu H-L, Liu F, Lian N, Wu R-R, Zhao J-P, Guo WB* (2018) Altered functional connectivity strength and its correlations with cognitive function in subjects with ultra-high risk for psychosis at rest. *CNS Neurosci Ther* 24: 1140–1148.
<https://doi.org/10.1111/cns.12865>
38. *Goldman-Rakic PS* (1997) Circuitry of primate prefrontal cortex and regulation of behavior by representation memory. *Handbook of Physiology Sect I Am Physiol Soc. Bethesda Maryland. V 5 part I*: 373.
39. *Miller EK, Cohen JD* (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24: 167–202.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
40. *Missonnier P, Herrmann FR, Zanella A, Badan M, Curtis L, Canovas D, Chantraine F, Richiardi J, Giannakopoulos P, Merlo MCG* (2012) Event-related potentials and changes of brain rhythm oscillations during working memory activation in patients with first-episode psychosis. *J Psychiatry Neurosci* 37(2): 95–105.
<https://doi.org/10.1503/jpn.110033>
41. *Gratton G* (1998) The contralateral organization of visual memory: a theoretical concept and a research tool. *Rev Psychophysiol* 35(6): 638–644.
<https://doi.org/10.1111/1469-8986.3560638>
42. *Malecki U, Stallforth S, Heipertz D, Lavie N, Duzel E* (2009) Neural generators of sustained activity differ for stimulus-encoding and delay maintenance. *Eur J Neurosci* 30(5): 924–933.

- <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06871.x>
43. Funahashi S, Takeda K (2002) Information processes in the primate prefrontal cortex in relation to working memory processes. *Rev Neurosci* 13(4): 313–345.
<https://doi.org/10.1515/revneuro.2002.13.4.313>
 44. Rowe J, Friston K, Frackowiak R, Passingham R (2002) Attention to Action: Specific Modulation of Corticocortical Interactions in Humans. *NeuroImage* 17(2): 988–998.
<https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1156>
 45. Ford JM, Mathalon DH (2012) Anticipating the future: Automatic prediction failures in schizophrenia. *J Psychophysiol* 83(2): 232–239.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2011.09.004>
 46. Smith ES, Crawford TJ (2021) Memory-Guided Saccades in Psychosis: Effects of Medication and Stimulus Location. *Brain Sci* 11: 1071–1088.
<https://doi.org/10.3390/brainsci11081071>

Evoked Synchronization of Theta EEG Rhythm during Preparation of Memory-Guided Saccades and Antisaccades in Normals and in Patients with Clinically High Risk for Schizophrenia

A. V. Pavlov^{a, #}, M. V. Slavutskaya^{a, b}, M. A. Omelchenko^b, A. V. Kotenev^a,
and I. S. Lebedeva^b

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Mental Health Research Center, Moscow, Russia*

[#] *e-mail: alexandersun121@gmail.com*

Received July 19, 2024; revised August 15, 2024; accepted September 2, 2024

Abstract

One of the informative and widely used approaches to understanding the pathogenetic (including neurobiological) mechanisms of schizophrenia is the study of patients with clinically high risk (CHR) for the disease. The power and topography of the theta rhythm event-related synchronization (ERS) related to peripheral stimulus that must be remembered (memory-guided saccades/antisaccades paradigm) have been studied in the groups of 20 mentally healthy subjects and 20 patients with CHR. The analysis was carried out according to the Pfurtscheller method. Based on the saccades latency value and the error numbers, the task performance was decreased in patients with CHR compared to healthy subjects. Intergroup differences by theta rhythm ERS magnitude and topography were found for three consecutive delay period intervals (900 ms each) before saccades to the right and antisaccades to the left. The findings are considered as being the reflection of violations of the spatial attention and working memory maintaining in CHR patients that has a certain interhemispheric asymmetry. It has been suggested an activation of the compensatory processes and the cognitive control reorganization of the frontoparietal networks with predominantly right hemisphere preservation at the early stage of schizophrenia development.

Keywords: CHR for schizophrenia, the EEG theta rhythm evoked synchronization, cognitive control, memory, attention, “memory-guided saccades” paradigm

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ АПОПТОЗ-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ
В ВИСОЧНОЙ КОРЕ И ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ
КИНДЛИНГЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ МИНОЛЕКСИНА**

© 2024 г. Е. Д. Бажанова^{1,2,*}, А. А. Козлов², Ю. О. Соколова², А. А. Супонин³,

Е. О. Демидова²

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

²Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова Федерального
медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: bazhanovae@mail.ru

Поступила в редакцию 11.07.2024 г.

После доработки 17.08.2024 г.

Принята к публикации 02.09.2024 г.

Эпилепсия – одно из наиболее распространенных и одновременно серьезных заболеваний головного мозга, от которого страдают более 70 миллионов человек во всем мире. Имеющиеся противосудорожные препараты способны подавить приступы у двух третей больных, у оставшейся трети пациентов эпилепсия признается фармакорезистентной и требует иных видов лечения, таких как хирургическое вмешательство, которое также не всегда приводит к положительным результатам. Преодоление резистентности – сложная комплексная задача, для решения которой требуется понимание биохимических путей и общих патологических процессов, лежащих в основе эпилепсии, в первую очередь апоптоза. Целью данной работы стало изучение влияния антибиотика минолексина на уровни апоптоза и экспрессию апоптоз-ассоциированных молекул (p53, Bcl-2, каспаза-3 и каспаза-8) в височной коре, подлежащем белом веществе и гиппокампе крыс линии Крушинского – Молодкиной (КМ) с наследственной аудиогенной эпилепсией при длительном киндлинге. Использованы крысы КМ в возрасте 11 месяцев, которых подвергали аудиогенной стимуляции и вводили внутривentricularно физраствор или антибиотик тетрациклинового ряда второго поколения минолексин в дозе 45 мг/кг, растворенный в физрастворе, в течение 14 дней, далее следовали 7 дней отдыха, после которых была проведена некропсия. Исследована кора височной доли и подлежащее белое вещество, гиппокамп. Оценивали уровни апоптоза (TUNEL) и экспрессию апоптоз-ассоциированных белков (p53, Bcl-2, каспаза-3 и -8) (иммуногистохимия, вестерн-блоттинг). У крыс линии КМ с наследственной аудиогенной эпилепсией показано повышение уровня апоптоза при длительном киндлинге во всех исследованных областях мозга. Выявлен p53-зависимый, но не зависящий от каспаз механизм активации апоптоза. При введении минолексина наблюдался антиапоптотический и нейропротективный эффект в височной доле и гиппокампе экспериментальных крыс.

Ключевые слова: эпилепсия, апоптоз, Bcl-2, p53, каспаза-3, каспаза-8, минолексин, крысы линии Крушинского – Молодкиной

DOI: 10.31857/S0869813924090134, **EDN:** AJDIYL

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия – одно из наиболее распространенных неврологических заболеваний, которым поражено более 70 миллионов человек по всему миру. Основу терапии составляют пероральные препараты. Их механизмы действия не отличаются большим разнообразием и основаны на блокировании каналов Na^+ и/или Ca^{2+} , стимулировании ГАМК или ингибировании передачи сигналов глутамата. Они могут подавлять судороги у двух третей больных, но даже в этом случае не изменяют долгосрочный прогноз, а у оставшейся трети пациентов эпилепсия признается фармакорезистентной и требует иных методов лечения, включая хирургическое вмешательство, также не дающих гарантий излечения. Поиск лекарств от эпилепсии не прекращается, что обусловлено сохраняющейся лекарственной устойчивостью. В настоящее время разработка методов лечения сосредоточена на исследовании механизмов действия новых препаратов, терапии, специфичной для синдромов, и поиске общих патологических механизмов [1].

К таким общим патологическим механизмам, лежащим в основе не только эпилепсии, но и других заболеваний ЦНС, относится дегенерация нейронов. Выделяют более 12 типов клеточной гибели, среди которых в патогенезе эпилепсии, особенно фармакорезистентной, наибольшее значение имеет апоптоз нейронов и глиальных клеток головного мозга [2].

Апоптоз – это физиологический процесс запрограммированной гибели клеток, который играет важную роль как при развитии и нормальном функционировании нервной системы, так и при ее патологиях. Основные особенности апоптоза включают агрегацию хроматина в большие массы, примыкающие к ядерной мембране, сохранение целостности внутриклеточных органелл и рассеивание клеточного содержимого в окруженных мембраной «апоптотных тельцах» [3]. Эксперименты выявили закономерности фрагментации ДНК в поврежденном судорожным припадком мозге, говорящие об активации апоптоза [3]. Апоптоз, особенно выраженный в гиппокампе, может быть одной из причин формирования лекарственной устойчивости из-за усиливающегося с каждым следующим судорожным припадком повреждения структур мозга [4]. Клеточная гибель может осуществляться двумя путями: внешнерецепторным и внутренним митохондриальным. В отличие от некроза, апоптоз осуществляется высокоупорядоченным молекулярным механизмом, который требует энергии и может включать транскрипцию специфических генов – проапоптотического фактора транскрипции p53, выполняющих различные функции белков семейства Bcl-2 и каспаз [5].

Фактор транскрипции и супрессор опухолей p53 – тетрамерный фосфопротеин, который управляет рядом основных клеточных функций, включая транскрипцию генов, синтез и репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, старение и гибель клеток. Этот белок является одним из ключевых модуляторов реакции клеток на стресс, активация которого запускает апоптоз в различных типах клеток, в число которых входят и нейроны. В нервной системе p53 активен при ее формировании в норме и при различных неврологических расстройствах, таких как инсульт, болезни Альцгеймера и Паркинсона, синдром Ангельмана, черепно-мозговые травмы, боковой амиотрофический склероз, аутизм, спиноцеребеллярная атаксия и эпилепсия [6].

Белок Bcl-2 (B Cell Lymphoma/Leukaemia 2) массой 26 кДа способствует развитию злокачественных опухолей, не давая их клеткам погибнуть, но при этом не усиливая пролиферацию [7]. Bcl-2 – член обширного и консервативного семейства белков, обладающих как про-, так и антиапоптотическими свойствами. Он помогает нейронам пережить неблагоприятные воздействия, такие как окислительный стресс [8]. Изучение ткани головного мозга пациентов с эпилепсией показало значительное увеличение уровней белка Bcl-2 у людей с ее лекарственно-устойчивыми формами. Также Bcl-2 положительно связан с продолжительностью, частотой и тяжестью эпилептических припадков [9].

Каспазы представляют собой эволюционно консервативные аспартат-специфические цистеиновые протеазы, присутствующие в клетках в качестве зимогенов, которые образуют активный фермент после протеолитического расщепления. Запускается каскад каспаз, который завершается активацией эффекторных каспаз, таких как каспаза-3, которые расщепляют ключевые внутриклеточные структурные белки и белки выживания и активируют фермент, ответственный за характерную фрагментацию ДНК. В настоящее время идентифицировано 18 каспаз млекопитающих, которые можно разделить на провоспалительные, противовоспалительные, исполнительные и обладающие еще неизвестными функциями [10].

Во время апоптоза активированная каспаза-3 расщепляет широкий спектр субстратов, что приводит к характерным морфологическим изменениям в клетках. Она играет ключевую роль в регуляции роста и поддержании гомеостатического состояния как нормальных, так и злокачественных клеток и тканей в многоклеточных организмах. Участие каспазы-3 в патогенезе как острых, вызванных инсультом или травмой, так и вялотекущих нейродегенеративных заболеваний сводится к апоптозу определенных популяций клеток [11].

Каспаза-8 опосредует гибель клеток в ответ на внешние сигналы, но ее роль также не сводится лишь к этому. Сложность биохимических путей и сходящихся на ней взаимодействий таковы, что ее новые функции продолжают открывать спустя более чем 20 лет. Большую их часть можно описать собирательным термином «паноптоз», который в основном включает в себя три вида запрограммированной гибели клеток, а именно пироптоз, апоптоз и некроптоз [12].

Первичный эпилептический фокус при аудиогенной эпилепсии находится в слуховом стволе. Гиппокамп и кора рекрутируются вторично в ходе киндлинга. Ранее уже проводились исследования молекулярно-клеточных изменений в гиппокампе при аудиогенном киндлинге, было показано усиление пролиферативной активности гиппокампа при отсутствии дегенеративных процессов в этой структуре [13]. Таким образом, аудиогенный киндлинг является адекватной моделью для исследования изменений мозга, вызванных судорожной активностью.

Повреждение тканей височной доли чаще всего вызывает эпилептические припадки, что стало относительно ясно к концу 1880-х годов [14]. Примерно у 60% пациентов наблюдается фокальная форма эпилепсии, и в трети этих случаев, когда эпилептический очаг локализуется преимущественно в височной доле, имеющиеся лекарственные препараты бессильны. Височные доли являются наиболее эпилептогенной областью головного мозга прежде всего потому, что в наибольшей степени страдают от гипоксии, на их долю приходится множество травм. Судороги, возникающие в височных долях, весьма разнообразны по своему характеру, и некоторые из них могут быть столь непохожими на классическую эпилепсию, что с трудом поддаются диагностике. Подлежащее белое вещество, особенно его глубокие слои, участвует в генерализации приступов и их распространении далеко за пределы эпилептогенных зон при мезиальной височной эпилепсии. Эпилепсия приводит к общему снижению функциональной связанности в глубоких слоях. Показано, что при эпилепсии также наблюдаются значительные изменения морфофункциональных характеристик различных отделов гиппокампа [15].

Используемый нами антибиотик минолексин (миноциклин (4S,4aS,5aR,12aR)-4,7-бис(диметиламино)-1,10,11,12a-тетрагидрокси-3,12-диоксо-4a,5,5a,6-тетрагидро-4H-тетрацен-2-карбоксамид, C₂₃H₂₇N₃O₇), выпускаемый под торговой маркой «Минолексин», относится к тетрациклинам. Минолексин является полусинтетическим антибиотиком второго поколения тетрациклинового ряда [16]. Отмечается его превосходная пероральная абсорбция, биодоступность, приближающаяся к 100%, и способность проникать во все органы, в том числе в головной мозг. Обладая высокой липофильностью, он способен преодолевать гематоэнцефалический барьер, а благодаря

широкому спектру действия – справляться не только с инфекциями. [17]. Показано, что препарат оказывает защитное действие при множестве неврологических расстройств, включая травму спинного мозга, инсульт, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона и эпилепсию, в том числе не поддающуюся лечению другими препаратами [18]. Минолексин обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиапоптотическими свойствами, что позволяет использовать его при лечении неврологических расстройств [19]. Миноциклин показал выраженный нейропротективный эффект в модели эпилептического статуса у крыс при введении пилокарпина. Эпилептический статус вызывает острую и постоянную активацию микроглии и астроцитов в поле СА1 гиппокампа и прилегающей коре. Введение миноциклина один раз в день в дозе 45 мг/кг в течение 14 дней после эпилептического статуса с последующим шестинедельным мониторингом показало снижение активации микроглии, повышение уровней интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли- α в исследуемых зонах мозга, снижение потери нейронов, а также снижение частоты, продолжительности и тяжести судорог [20]. В экспериментах по лечению нейроинфекций были обнаружены нейропротективные, противовоспалительные и антиапоптотические свойства миноциклина. Препарат ингибировал апоптоз в нейронах головного мозга человека, на что указывало ингибирование активации каспазы-3 и поли-АДФ-рибозополимеразы [21]. Препарат уже показал многообещающие результаты в экспериментальной неврологии, что было связано с его высокой липофильностью, став безопасным и эффективным дополнением к антипсихотическим препаратам [22].

На основании данных литературы мы предположили, что минолексин, оказывающий положительный эффект в животных моделях эпилепсии, может делать это за счет уменьшения апоптоза и нейровоспаления в головном мозге. В связи с этим целью данной работы стало изучения влияния антибиотика минолексина на уровни апоптоза и экспрессию апоптоз-ассоциированных молекул (p53, Bcl-2, каспаза-3 и каспаза-8) в височной коре, подлежащем белом веществе и гиппокампе крыс линии Крушинского – Молодкиной (КМ) с наследственной аудиогенной эпилепсией при длительном киндлинге.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетическая предрасположенность к аудиогенной эпилепсии у крыс была выявлена еще в 1906 г., когда в Вистаровском институте (США) вывели аутбредную линию крыс Вистар (Wistar). Некоторые из крыс реагировали на громкие звуки эпилептоморфными припадками. С тех пор на их основе в разных странах было создано несколько линий крыс с аудиогенной эпилепсией. Одной из них стала линия крыс КМ, выведенная на биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова Л.В. Крушинским, Л.Н. Молодкиной и Д.А. Флессом. В настоящее время у этих животных хорошо изучены поведенческие, морфологические и генетические особенности, которые частично пересекаются с таковыми у больных эпилепсией людей и другими линиями грызунов с аудиогенной эпилепсией. Таким образом, они подходят для экспериментального моделирования эпилепсии [23].

В качестве экспериментальной модели эпилепсии нами были использованы самцы и самки крыс линии КМ в возрасте 11 месяцев, реагирующие на звук частотой 9 кГц и мощностью 50 дБ полным и стабильным клонико-тоническим судорожным припадком. В соответствии с целью и задачами эксперимента они были случайным образом разделены на следующие группы: киндлинг с введением физраствора (5 самцов и 5 самок), киндлинг с введением минолексина (5 самцов и 5 самок), контроль с введением физраствора (6 самок и 4 самца) (рис. 1). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденными санитарным врачом РФ от 29.08.2014 г.

№ 51, в поликарбонатных клетках по одной группе одного пола с круглосуточным доступом к воде и пище. Содержание животных осуществлялось в контролируемых условиях окружающей среды (при температуре 22 ± 3 °C и относительной влажности воздуха 30–70%), с 12-часовым циклом освещения.

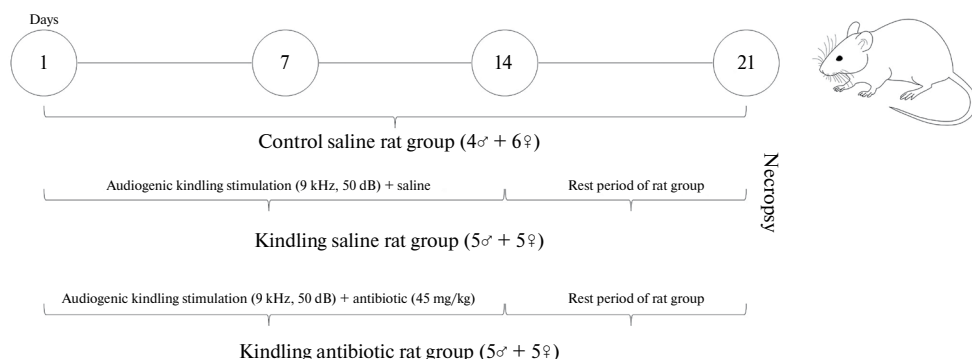


Рис. 1. План эксперимента.

В настоящее время в более чем 99% случаев крысы линии КМ в трехмесячном возрасте в ответ на звуковое воздействие демонстрируют развернутый судорожный припадок, который характеризуется стадией дикого бега и клонико-тоническими судорогами [24]. Распределение животных по группам было случайным. Внутривентрикулярные инъекции физраствора или минолексина в дозе 45 мг/кг, растворенного в физрастворе, проводились внутривентрикулярно по окончании каждой звуковой стимуляции (9 кГц, 50 дБ) в течение 14 дней. В качестве контрольной была взята группа крыс КМ, не подвергавшихся киндлингу и получавших инъекции физраствора. Эксперимент продолжался 14 дней, после чего был сделан перерыв длительностью 7 дней, во время которого животные не подвергались киндлингу и не получали препарат (рис. 1). Контроль эпилептических припадков у крыс производился визуально. Во время эксперимента у животных, подвергнутых киндлингу, фиксировался латентный период – время начала приступа (в пределах 60 с) от момента подачи звукового сигнала, а также особенности припадка, производилась видеорегистрация. С началом приступа воспроизведение звука останавливали.

После завершения эксперимента была проведена некропсия с использованием препарата «Золетил», перфузия физраствором, декапитация и извлечение головного мозга. Мозг каждой крысы разделяли на две половины в сагитальной плоскости. Правую половину мозга для иммуногистохимического (ИГХ) и TUNEL анализа фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере и оставляли на 2 дня при 4 °C, а затем переносили в раствор 20%-ной сахарозы на 5 дней. Далее помещали в емкость с изопентаном, находящуюся в сухом льду, на 1 мин при –50 °C, затем хранили при –80 °C. Чередующиеся срезы толщиной 5–6 мкм изготавливали на криостате (Leica, Германия) и фиксировали на предметных стеклах для проведения ИГХ. Согласно атласу мозга крысы [25], интерес представляла амигдало-пириформная область (височная кора) и гиппокамп (рис. 2).

Из левой половины иссекали дорсальный гиппокамп, кору и белое вещество височной доли для вестерн-блотта.

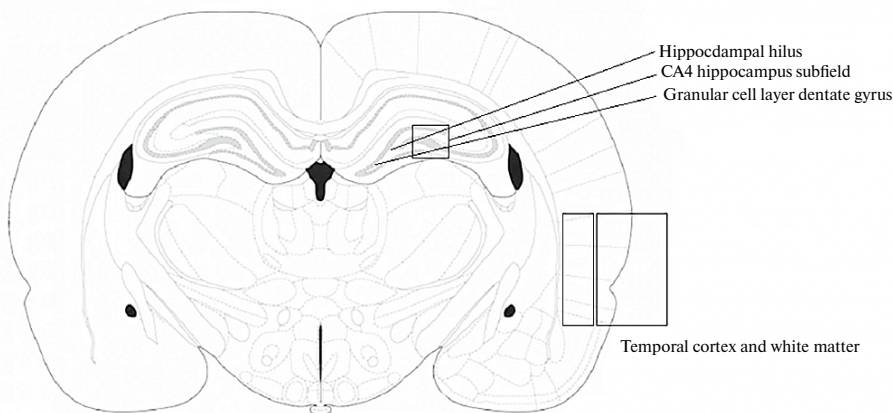


Рис. 2. Расположение исследуемых структур головного мозга крысы.

На срезах замороженных препаратов головного мозга (10 мкм, криотом Leica CM 1520) определяли уровень апоптоза методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) (набор для TUNEL In Situ, Elabscience E-CK-A320, Green, FITC). Также определяли экспрессию проапоптотического белка p53, антиапоптотического белка Bcl-2 и каспазы-3, -8 иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных антител к p53 и Bcl-2 (1: 100, SANTA CRUZ), выявление с помощью диаминобензидина.

Изображения срезов головного мозга были получены с помощью микроскопа PFM (WPI) с цветной камерой Leica DFC300 FX для анализа в разрешении 1280×960 пикселей и на сканирующем микроскопе для лабораторных исследований Pannoramic MIDI (3DHISTECH Ltd.) при увеличении $\times 200$. Подсчет оптической плотности проводился с использованием программы PhotoM версии 1.31 на 4–5 срезах исследуемой области головного мозга (височная кора, белое вещество, зубчатая извилина гиппокампа, область CA4 и хилус) каждого животного, далее рассчитывали среднюю оптическую плотность.

Для оценки изменений уровней белков каспазы-3 и -8 биоптаты височной коры, подлежащего белого вещества и гиппокампа гомогенизировали в лизирующем буфере с ингибиторами фосфатазы (Roche, #04906 837001) и протеазы (Sigma-Aldrich, #P8340). Общее количество белка оценивали по методу Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. Белки разделяли в 12%-ном полиакриламидном геле, затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz Biotechnology). Мембраны инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными поликлональными антителами к каспазе-3 (1: 1000; Abclonal), моноклональными антителами к каспазе-8 (1: 1000; Cloud-Clone Corp) и β -тубулину (1: 1000; Cloud-Clone Corp). Анализ блотов проводили методом денситометрии с учетом нормализации относительно окрашивания на весь белок с помощью Ponso с использованием геля-документирующей системы (ChemiDoc, BioRad, США). Также определяли экспрессию белка гена домашнего хозяйства тубулина, коррелирующего с общим количеством белка в пробе. Относительную плотность каждой белковой полосы определяли количественно с использованием программного обеспечения ImageJ 6.0.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро – Уилка

(Shapiro-Wilk test). Для сравнения равенства дисперсий использовался t -критерий Фишера. В случае нормального распределения сравнение проводилось параметрическим методом – дисперсионным анализом ANOVA, в остальных случаях сравнение производилось непараметрическим методом – критерием Краскела – Уоллиса. Апостериорные сравнения (пост-хок тесты) в случае использования ANOVA проводили с помощью критерия Тьюки. В случае ненормального распределения и применения критерия Краскела – Уоллиса апостериорные сравнения проводились критерием Данна. Значений, выходящих за пределы трех сигм, зарегистрировано не было.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе исследованы височная кора и подлежащее белое вещество, а также три области гиппокампа (гранулярный слой зубчатой извилины, хилус и подполе СА4). Выбор обусловлен тем, что данные зоны мозга наиболее часто повреждаются при эпилепсии, и очаги эпилептической активности часто локализуются в них. Показано, что при эпилепсии наблюдаются значительные изменения морфофункциональных характеристик различных отделов гиппокампа. Еще в 1825 г. результаты вскрытий показали, что гиппокамп сморщен и кальцинирован у людей с эпилепсией. Многие пациенты, особенно со склерозом гиппокампа, помимо судорог испытывают когнитивные трудности [15]. При эпилепсии в нем отмечается появление аномальных возбуждающих цепей, изменения рецепторов и мембран, аберрантный нейрогенез в хилусе и синаптогенез с прорастанием мшистых волокон, появление мутантных форм ГАМК- и каинатных рецепторов, реактивный астроцитарный глиоз [26].

В височной коре крыс линии КМ с наследственной аудиогенной эпилепсией (рис. 3а) в контроле наблюдается низкий уровень апоптоза (количество TUNEL-позитивных клеток), он повышается при киндлинге в группе крыс, получавших физраствор, и снижается у крыс, подвергшихся киндлингу при одновременном введении минолексина. Различия между всеми тремя группами статистически значимы при $F_{(2, 21)} = 15.39$; $p = 0.0001$.

В белом веществе наблюдаются сходные изменения (рис. 3б). В контрольной группе уровень апоптоза низкий, увеличивается в группе Киндлинг физраствор и уменьшается в случае введения минолексина на фоне киндлинга. Данные изменения носят статистически достоверный характер при $F_{(2, 21)} = 12.86$; $p = 0.01$.

Для всех исследуемых областей гиппокампа (поле СА4, гранулярный слой зубчатой извилины и хилус) различия между всеми тремя группами (рис. 3с – е и 4а – е, f – k) аналогичны и носят статистически значимый характер при $F_{(2, 20)} = 4.17$; $p = 0.03$, $F(2, 20) = 24.10$; $p = 0.0001$ и $F_{(2, 20)} = 14.86$; $p = 0.0001$ соответственно.

Таким образом, длительный аудиогенный киндлинг приводит к индукции гибели клеток всех исследованных областей мозга – коры, подлежащего белого вещества и различных зон гиппокампа. Введение минолексина крысам предупреждает активацию апоптоза при киндлинге в этих участках мозга. У получавших минолексин крыс при киндлинге уровни апоптоза остались выше по сравнению с животными контрольной группы, не подвергавшимися киндлингу, за исключением хилуса и поля СА4 гиппокампа, где количество TUNEL-позитивных клеток соответствует таковому в контроле.

Мы исследовали экспрессию одного из основных активаторов апоптоза, онкопротектора р53, при длительном киндлинге и введении минолексина. В височной коре у крыс линии КМ, подвергшихся киндлингу и не получивших лечение (рис. 4а), наблюдается статистически значимый рост экспрессии р53, $F_{(2, 23)} = 3.71$; $p = 0.04$ по сравнению с контролем, что говорит об активации р53-зависимого каскада апоптоза при эпилептических припадках. Введение минолексина оказывает положительный эффект, снижая экспрессию р53 до значений, близких к контрольным.

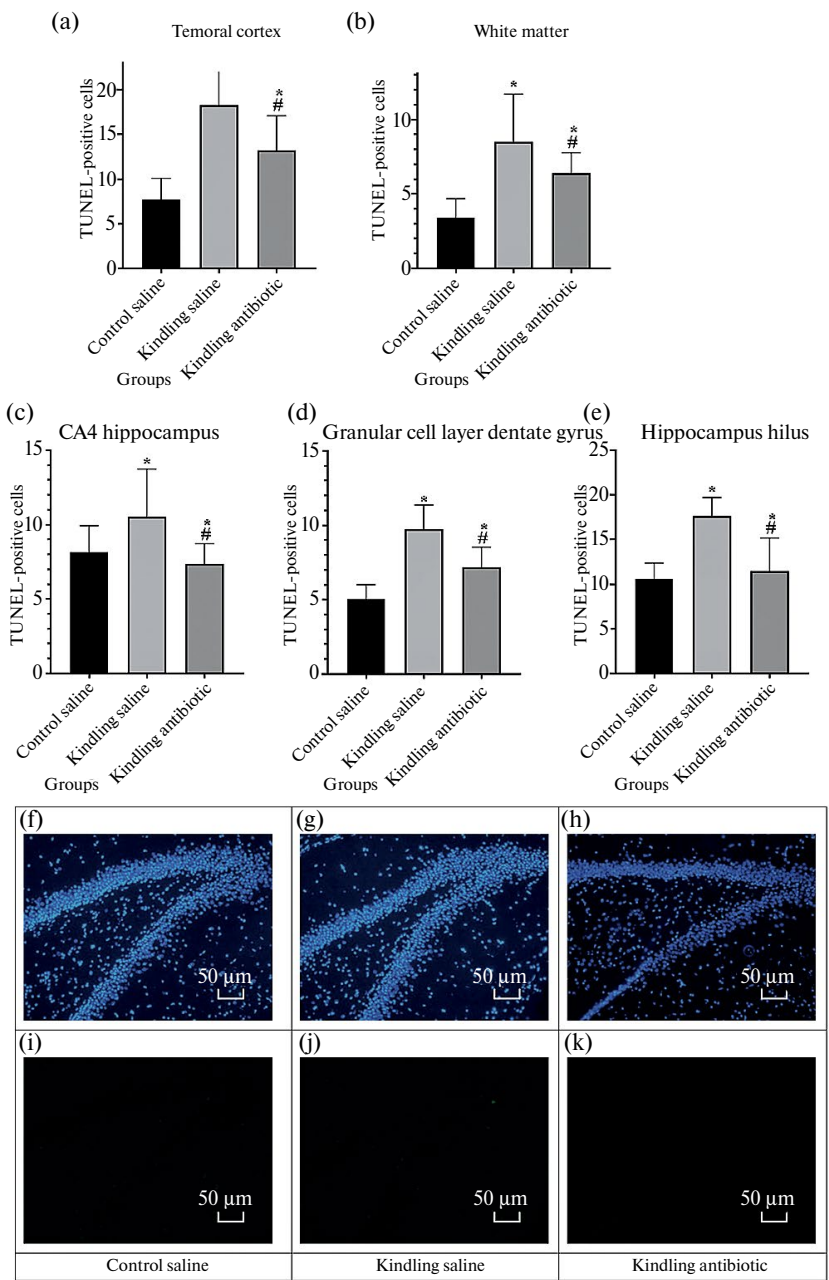


Рис. 3. Изменения числа TUNEL-позитивных клеток в исследуемых отделах головного мозга крыс Крушинского – Молодкиной. (а) – кора височной доли, (б) – белое вещество, (с) – поле CA4 гиппокампа, (д) – гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа, (е) – хилус гиппокампа. TUNEL-позитивные клетки в гиппокампе крыс линии Крушинского – Молодкиной, x200. (f) – Контроль физраствор, DAPI, (g) – Киндлинг физраствор, DAPI, (h) – Киндлинг антибиотик, DAPI, (i) – Контроль физраствор, TUNEL, (j) – Киндлинг физраствор, TUNEL, (k) – Киндлинг антибиотик, TUNEL. $p < 0.05$ по сравнению: * с группой Контроль физраствор, # с группой Киндлинг физраствор.

В подлежащем белом веществе (рис. 4b) имеет место аналогичная картина со статистически значимым ($F_{(2, 23)} = 13.38$; $p = 0.0001$) усилением экспрессии p53 после киндинга и его снижением до близких к контрольным значениям у животных, дополнительно получавших инъекции минолексина.

В поле СА4 гиппокампа достоверных изменений не выявлено ($F_{(2, 24)} = 0.59$; $p = 0.62$), и экспрессия p53 не менялась при киндинге и введении минолексина (рис. 4c).

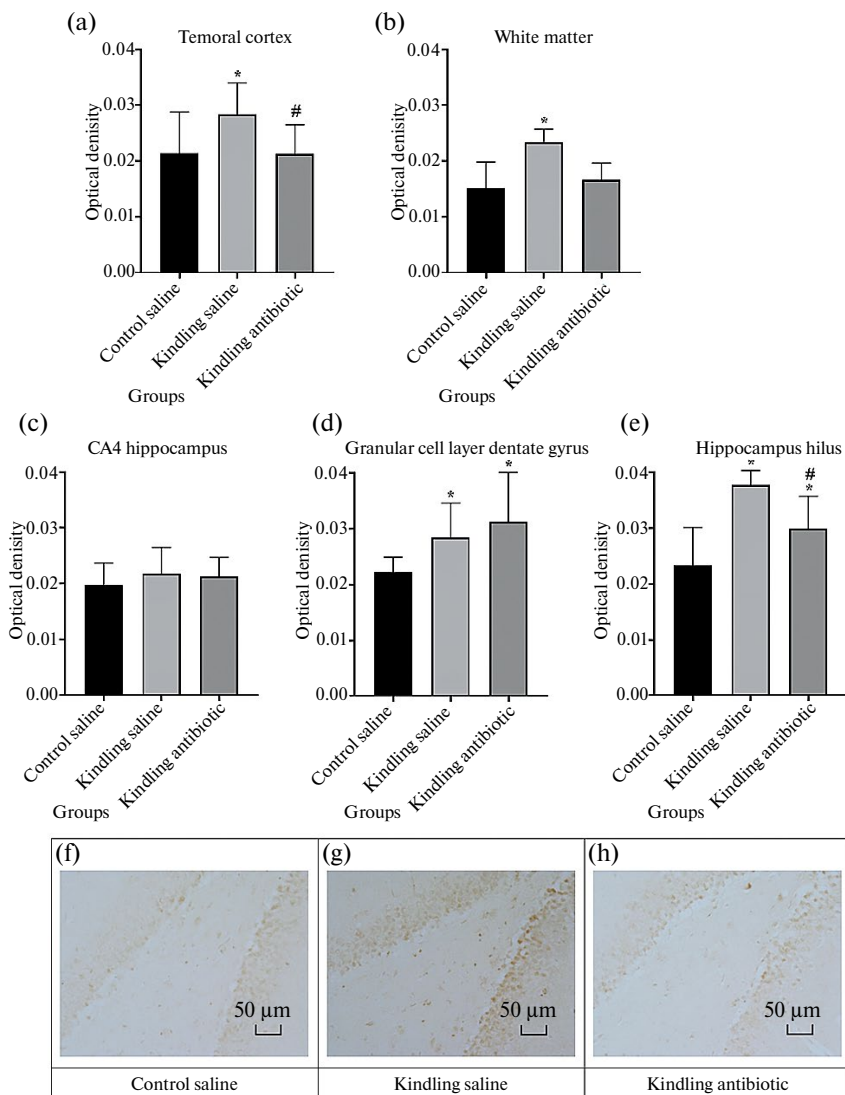


Рис. 4. Уровень экспрессии p53 в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского – Молодкиной. (а) – кора височной доли, (б) – белое вещество, (с) – поле СА4 гиппокампа, (д) – гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа, (е) – хилус гиппокампа. p53-иммунопозитивные клетки в гиппокампе крыс линии Крушинского – Молодкиной. Иммуногистохимия, $\times 200$. (f) – Контроль физраствор, (g) – Киндлинг физраствор, (h) – Киндлинг антибиотик. $p < 0.05$ по сравнению: * с группой Контроль физраствор, # с группой Киндлинг физраствор.

В гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа введение минолексина не показало положительного эффекта, и экспрессия p53 в экспериментальных группах статистически достоверно отличалась от контроля в большую сторону при $F_{(2, 21)} = 3.14$; $p = 0.01$ (рис. 4d). Однако это говорит не о бесполезности минолексина, а о не связанных с p53 механизмах апоптоза, так как при лечении его уровень снижался (рис 3b).

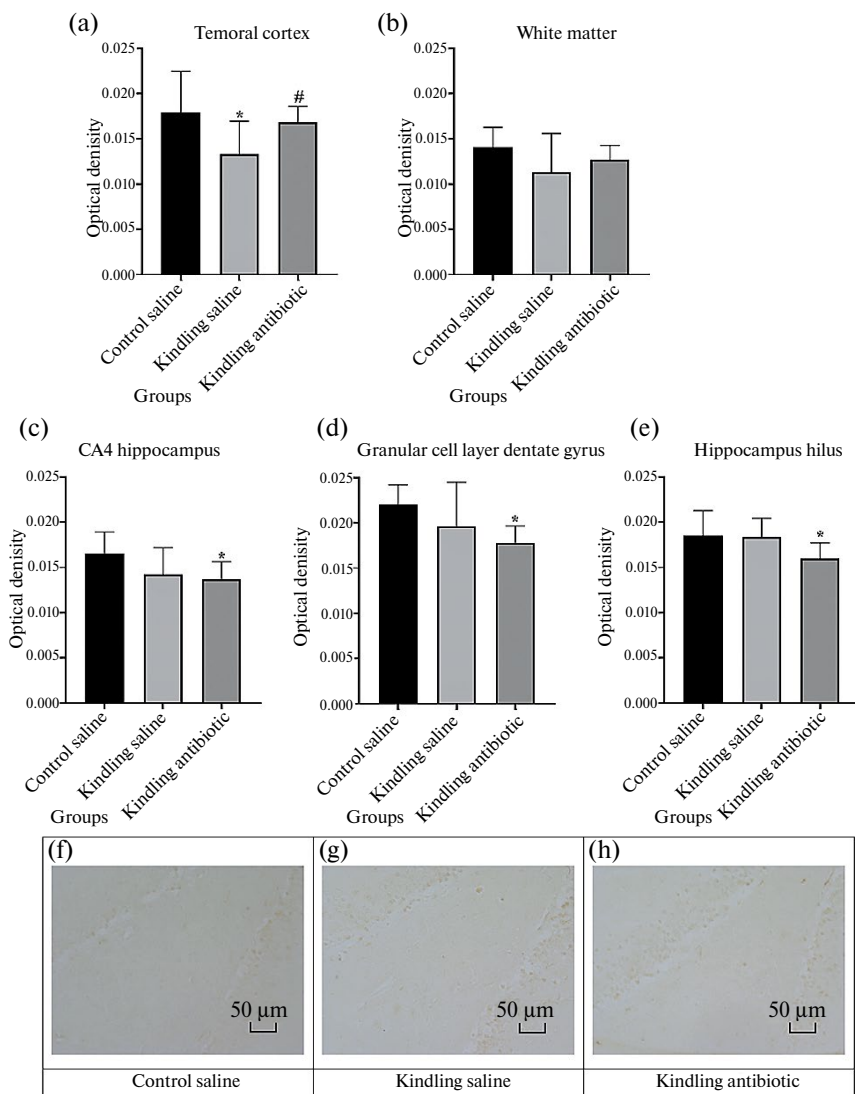


Рис. 5. Уровень экспрессии Bcl-2 в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского – Молодкиной. (а) – кора височной доли, (б) – белое вещество, (с) – поле СА4 гиппокампа, (д) – гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа, (е) – хилус гиппокампа. Bcl-2-иммунопозитивные клетки в гиппокампе крыс линии Крушинского – Молодкиной, Иммуногистохимия, x200. (f) – Контроль физраствор, (g) – Киндлинг физраствор, (h) – Киндлинг антибиотик. $p < 0.05$ по сравнению: * с группой Контроль физраствор, # с группой Киндлинг физраствор.

В хилусе гиппокампа после киндлинга наблюдался рост экспрессии p53 по сравнению с контрольной группой ($F_{(2, 22)} = 9.04$; $p = 0.006$) и его снижение при введении антибиотика по сравнению с крысами, проходившими киндлинг и не получавшими лечения (рис. 4е, f–h).

Таким образом, в височной коре и белом веществе динамика экспрессии p53 примерно соответствует изменениям количества TUNEL-позитивных клеток. В гиппокампе изменения экспрессии p53 зависели от зоны гиппокампа – отсутствие изменений в зоне СА4, активация p53-каскада при киндлинге в гранулярном слое и хилусе, при этом в гранулярном слое при введении минолексина уровень p53 был повышен по сравнению с контролем и группой киндлинг, а в хилусе введение минолексина приводило к снижению синтеза p53 по сравнению с группой киндлинг.

В височной коре крыс линии КМ (рис. 5а) при киндлинге наблюдается достоверное снижение экспрессии Bcl-2 по сравнению с контрольной группой и его повышение при лечении минолексинем ($F_{(2, 22)} = 3.66$; $p = 0.04$), что соотносится с уровнем апоптоза. В белом веществе картина иная, и экспрессия Bcl-2 постоянна во всех трех группах ($F_{(2, 22)} = 1.86$; $p = 0.26$).

Во всех трех исследуемых областях гиппокампа картина принципиально сходна – киндлинг не изменяет экспрессию Bcl-2, а введение минолексина снижает ее, $F_{(2, 23)} = 3.71$; $p = 0.04$ для поля СА4, $F_{(2, 21)} = 3.89$; $p = 0.0058$ для гранулярного слоя зубчатой извилины и $F_{(2, 23)} = 3.74$; $p = 0.03$ для хилуса соответственно (рис. 5с – е и f–h).

Таким образом, этот антиапоптотический белок играет различную роль в противодействии апоптозу в зависимости от области мозга, мы наблюдали повышение экспрессии Bcl-2 в коре при введении минолексина, и этому соответствует снижение уровня апоптоза, отсутствие изменений в белом веществе и снижение уровня этого белка в гиппокампе, где, вероятно, играют роль другие антиапоптотические белки.

В височной коре крыс линии КМ, предрасположенных к аудиогенным судорогам, статистически значимых изменений экспрессии caspase-3 не зафиксировано, $F_{(2, 9)} = 0.33$; $p = 0.73$ (рис. 6а). В подлежащем белом веществе зафиксировано достоверное снижение экспрессии каспазы-3 при киндлинге независимо от того, получали ли крысы минолексин, по сравнению с контрольной группой $F_{(2, 21)} = 5.46$; $p = 0.01$ (рис. 6б). В гиппокампе значимых изменений уровня экспрессии каспазы-3 не выявлено, $F_{(2, 21)} = 0.76$; $p = 0.48$ (рис. 6с).

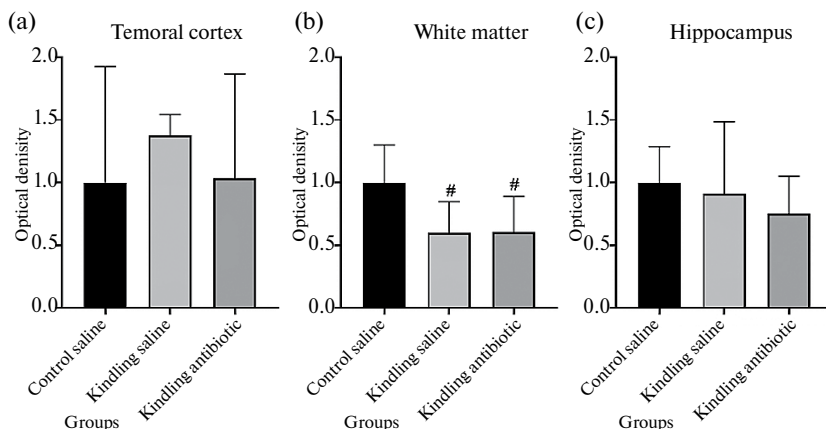


Рис. 6. Изменения оптической плотности каспазы-3-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского – Молодкиной. (а) – кора височной доли, (б) – белое вещество, (с) – гиппокамп. # $p < 0.05$ по сравнению с группой Киндлинг физраствор.

В височной коре крыс линии КМ (рис. 7а), а также в гиппокампе (рис. 7с) статистически значимых изменений экспрессии каспазы-8 не выявлено при $F_{(2,21)} = 0.78$; $p = 0.47$ и $F_{(2,21)} = 0.75$; $p = 0.49$ соответственно. В подлежащем белом веществе ее экспрессия при введении минолексина достоверно снижалась, и здесь обнаружены различия как с контрольной группой, так и с животными, подвергавшимися киндлингу и не получавшими лечения, $F_{(2,21)} = 8.48$; $p = 0.003$ (рис. 7б).

Таким образом, в эксперименте не изменялась экспрессия каспазы-3 и -8 в височной коре и гиппокампе, и наблюдалось снижение ее экспрессии в белом веществе при киндлинге (только каспазы-3) и при сопутствующем введении минолексина (обе каспазы).

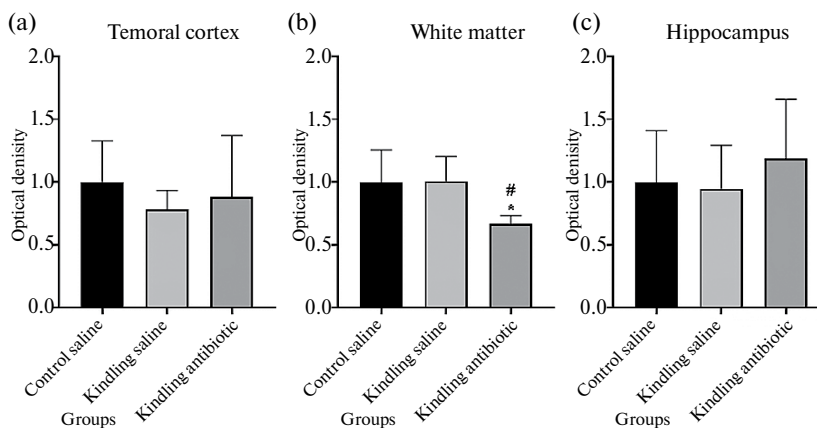


Рис. 7. Изменения оптической плотности каспазы-8-иммунореактивного материала в исследуемых отделах головного мозга крыс линии Крушинского – Молодкиной. (а) – кора височной доли, (б) – белое вещество, (с) – гиппокамп. $p < 0.05$ по сравнению: * с группой Контроль физраствор, # с группой Киндлинг физраствор.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время является актуальным поиск средств для терапевтического лечения фармакорезистентной эпилепсии. Предполагается, что в развитии фармакорезистентности играют роль нейровоспаление и апоптоз. В связи с этим активно проводятся исследования молекулярных механизмов судорожной активности мозга и возможности фармакологической коррекции нарушений. Так, в эксперименте с киндлингом миндалевидного тела (амигдалы) 45 взрослым самцам крыс линии Wistar были имплантированы биполярные стимулирующие и монополярные регистрирующие электроды, заканчивающиеся в базолатеральной миндале. За 60 мин до электрической стимуляции, проводившейся дважды в день с минимальным интервалом 6 ч, животным внутривенно вводился раствор миноциклина в дозах 50, 25 и 12.5 мг/кг. Миноциклин оказывал противосудорожное действие на прошедших киндлинг крыс, а его введение в дозе 25 мг/кг в течение 10 дней оказывало также противозиплептогенное действие во время киндлинга и отодвигало начало судорожных припадков [27]. Миноциклин и другие тетрациклины, такие как доксициклин, нашли применение в экспериментальной неврологии, став дополнением к классическим лекарственным средствам [22]. В литературе имеются сведения о положительном опыте применения миноциклина у людей. У 53-летнего пациента после операции по удалению астроцитомы начались эпилеп-

тические припадки. Обследование выявило лекарственно-устойчивую симптоматическую фокальную эпилепсию с частыми припадками. Различные противосудорожные препараты не оказали положительного эффекта. В этой ситуации по показаниям, не предусмотренным инструкцией, в схему лечения был добавлен миноциклин в дозировке 50 мг два раза в день из-за его противовоспалительных эффектов, что оказало выраженный противосудорожный эффект [28].

Морфофункциональные изменения при эпилепсии затрагивают в первую очередь височную долю и гиппокамп. Согласно классификации эпилептических синдромов, височная эпилепсия делится на два основных типа. Первый – медиальная, при которой приступ возникает преимущественно в височных медиальных структурах, таких как гиппокамп, энторинальная кора, миндалевидное тело и парагиппокампальная извилина. Вторым является латеральная или неокортексная эпилепсия, при которой патологический процесс затрагивает височный неокортекс, который включает верхнюю, медиальную и нижнюю височные извилины, височно-затылочные и височно-теменные области, а также ассоциативные сенсорные области слухового и зрительного анализаторов, речевые центры [29].

Аномалии височной коры часто встречаются у пациентов с эпилепсией. Измененная морфология поверхности, в том числе значительная структурная атрофия, была выявлена у пациентов в переднемедиальных областях ипсилатерально. Эта локализованная регионарная атрофия тесно коррелирует со структурными изменениями, обнаруженными в гиппокампе. Причиной прогрессирующей атрофии коры, в том числе за пределами эпилептогенных зон, является нагрузка из-за повторяющихся судорожных припадков [30]. Эти данные подтверждают актуальность нашего исследования.

В проведенном эксперименте мы наблюдали повышение уровня апоптоза при длительном киндлинге в височной доле (кора и белое вещество) и гиппокампе у крыс КМ, при активации р53-зависимого пути в височной доле и хилусе. По данным других авторов, у пациентов со склерозом гиппокампа обнаружена атрофия зубчатой извилины и СА4, что показали автоматизированная волнометрия и гистологическое исследование подполей [31]. Снижение количества олигодендроцитов в СА4 и гранулярных нейронов в зубчатой извилине отмечается не только при эпилепсии, но и при шизофрении [32], нарушениях сна и депрессии [33]. Значительные микроструктурные изменения в поле СА4, а также в зубчатой извилине проявляются на ранних стадиях болезни Альцгеймера, тогда как СА1–3 вовлекаются в патологический процесс позже [34]. Выявлено антиапоптотическое действие минолексина при киндлинге во всех исследованных областях мозга. Полученные результаты согласуются с другими исследованиями, согласно которым антибиотик оказывает нейропротекторное действие на животных моделях травм ЦНС и некоторых нейродегенеративных заболеваний [35]. Минолексин обладает нейропротекторным действием при ишемии головного мозга. Его введение ингибирует активацию микроглии, что вызывает снижение продукции воспалительных цитокинов, включая $\text{TNF-}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$, активности и пролиферации Т-клеток, ингибирование индуцибельной синтазы оксида азота, снижение концентрации свободных радикалов, включая супероксид-анион, гидроксильный радикал и перекись водорода в условиях окислительного стресса. Снижение перекисного окисления липидов связано с повышением активности антиоксидантных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и др.) [36]. Возможно, именно противовоспалительное действие минолексина определило нейропротекторный эффект в нашем эксперименте. Определение количества TUNEL-позитивных клеток подтвердило нейропротекторные и антиапоптотические эффекты минолексина *in vivo* посредством ингибирования апоптоза в модели контролируемой кортикальной травмы мозга у крыс, выявлено снижение дефицита двигательной функции в тесте с ходьбой по сужающейся дорожке [37].

Введение минолексина крысам KM, подвергнутым аудиогенному киндлингу, приводило к супрессии p53-зависимого пути апоптоза в височной доле (кора и подлежащее белое вещество) и в хилусе гиппокампа, в зоне CA4 и гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа этого эффекта не выявлено. Другими авторами также показано, что введение миноциклина через 1 ч после черепно-мозговой травмы и субарахноидального кровоизлияния у крыс Sprague-Dawley уменьшало отек головного мозга и защищало его от p53-ассоциированного апоптоза и воспаления, индуцированного NLRP3-инфламмасомой, которая контролирует созревание и высвобождение провоспалительных цитокинов, в основном интерлейкина-1 β (IL-1 β) [38]. В другом эксперименте крысам Sprague-Dawley проводили двусторонний зажим почечной артерии в течение 30 мин с последующей реперфузией и вводили миноциклин либо физиологический раствор в течение 36 ч перед ишемией. Уже через 24 ч после ишемии подтвердился антиапоптотический эффект миноциклина (снижение количества TUNEL-позитивных клеток). Он также уменьшал высвобождение цитохрома c в цитоплазму и снижал активацию p53 и Bax [39]. В эксперименте по изучению токсичности билирубина на рыбках данио была выявлена опасность билирубина для нервной системы и описаны вызванные им двигательные нарушения. Гены врожденного иммунитета и гены, связанные с апоптозом, такие как гены белков TLR4, NF- κ B p65, STAT3 и p53, усиленно экспрессировались при концентрации билирубина 10 мкг/мл. Введение миноциклина рыбкам уменьшало нейроповеденческие расстройства, вызванные билирубином, при этом экспрессия p53 снижалась [40]. Однако есть и противоположные данные. Лечение миноциклином мышей с ксенотрансплантатами рака яичников OVCAR-3 приводило к ингибированию белка (HIF)-1 α (индуцируемый гипоксией фактор) и повышению уровня p53 с инактивацией пути AKT/mTOR/p70S6K/4E-BP1 [41].

Полученные результаты показали, что снижение уровня Bcl-2 при длительном киндлинге наблюдается только в височной коре, при этом введение минолексина возвращает его уровень к контрольным значениям, что, очевидно, играет роль в снижении апоптоза. Мы не выявили ключевой роли антиапоптотического белка Bcl-2 в поддержании выживаемости клеток при длительном аудиогенном киндлинге в белом веществе и гиппокампе крыс линии KM. Возможно, за это отвечают другие белки из его семейства, такие как Mcl-1. Данные других авторов об участии минолексина в регуляции экспрессии Bcl-2 в мозге при различных патологиях также различны. Введение минолексина усиливает экспрессию Bcl-2, снижает экспрессию Bax и каспазы-3 у крыс Sprague-Dawley в эксперименте с черепно-мозговой травмой и субарахноидальным кровоизлиянием [38], повышает экспрессию Bcl-2 в опыте с перекручиванием яичников для изучения ишемии и апоптоза у крыс Wistar [42], при моделировании глаукомы с перерезанием зрительного нерва у крыс Wistar [43]. При имитации варикоцеле у крыс Wistar миноциклин снижал Bax и усиливал экспрессию гена и белка Bcl-2 по сравнению с контрольной группой. Кроме того, введение миноциклина значительно снижало скорость апоптоза половых клеток, что подтверждено методом TUNEL [44]. В других условиях миноциклин может действовать как противоопухолевый препарат. Экспозиция миноциклина на линии MCF-7 опухолевых клеток из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека вызвала усиление апоптоза, повышение экспрессии Bax и каспазы-3 и снижение уровней Bcl-2 и прокаспазы-3 [45].

В нашем эксперименте не выявлено повышения уровней инициаторной каспазы-8 и эффекторной каспазы-3 при длительном киндлинге во всех изученных отделах мозга, можно предположить, что период отдыха после киндлинга (7 дней) не дает возможности обнаружить повышение каспаз в период киндлинга или сразу после его окончания в головном мозге крыс KM. Влияние минолексина в этом случае на экспрессию каспаз носило ограниченный характер, отмечено снижение уровня каспаз только в белом веществе. Возможно, имеют место механизмы апоптоза, не зависящие от каспаз, и ней-

ропротекторный эффект минолексина обусловлен в основном его супрессирующим действием на p53, либо здесь могут присутствовать иные механизмы. Так, эпилептический припадок связан с окислительным стрессом и митохондриальной дисфункцией. Основным триггером апоптоза в этом случае может выступать консервативный митохондриальный трансмембранный белок, индуцирующий апоптоз (AIF), способный без каспаз индуцировать конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК. В поле зрения исследователей он попал в 1994 г., когда было замечено, что на ранних стадиях апоптоза падает митохондриальный трансмембранный потенциал из-за повреждения митохондрий. AIF высвобождался в цитозоль, далее он проникал в ядра. Помимо апоптогенной активности AIF проявляет NADH-оксидазную активность и участвует в регуляции проницаемости мембран митохондрий. Его блокирование антителами или нокаут гена показали, что AIF нужен для запуска апоптоза в ответ на некоторые стимулы. Он важен для гибели клеток во время кавитации эмбрионидных тел, самой первой волны каспазо-независимой гибели клеток, необходимой для морфогенеза мышей [46]. В то же время AIF играет защитную роль благодаря NADH-оксидоредуктазной активности, пока находится на своем месте. Функция белка меняется в процессе деубиквитинирования деубиквитиназой 1 OTU (OTUD1). Деубиквитинирование AIF по K244 изменяет нормальную структуру митохондрий, нарушая процесс окислительного фосфорилирования, а деубиквитинирование AIF по K255 усиливает ДНК-связывающую способность, из-за чего клетка гибнет [47].

Данные других авторов говорят о том, что миноциклин способен подавлять экспрессию каспазы-3 и -8. В эксперименте с повреждением сетчатки глаз крыс, вызванным действием света, активность каспазы-3 возрастала, но введение миноциклина до или после светового повреждения в дозах 30 и 45 мг/кг соответственно приводило к уменьшению количества TUNEL-позитивных фоторецепторов и ослабляло экспрессию каспазы-3 [48]. При экспериментальном диабете, вызванном введением стрептозотоцина, развивается диабетическая ретинопатия. Введение миноциклина подавляет выработку воспалительных цитокинов, уменьшает их высвобождение из активированной микроглии и снижает активность каспазы-3 в сетчатке крыс Sprague-Dawley. Такой же результат достигнут на культуре нейронов сетчатки R28 и микроглии [49]. В мышинной модели болезни Гентингтона R6/2 – аутосомно-доминантного нейродегенеративного заболевания, которое в настоящее время не поддается лечению, после ишемии миноциклин ингибировал активацию мРНК каспазы-3 и -1, сдерживая прогрессирование симптомов [50]. Миноциклин защищал волосковые клетки внутреннего уха крыс Sprague-Dawley от повреждений при введении ототоксичного антибиотика (аминогликозида гентамицина), ингибируя сразу три пути: фосфорилирование p38 MAPK, высвобождение цитохрома c и активацию каспазы-3 [52]. Таким образом, миноциклин обладает защитной активностью при различных моделях апоптоза, очевидно, в зависимости от условий, кроме того, действие его может быть тканеспецифичным. Нейропротективное действие миноциклина, обусловленное ингибированием активации микроглии и каспазы-3, может помочь при японском энцефалите – вирусном природно-очаговом заболевании, которое переносится комарами. Специфического лечения японского энцефалита не существует, а у больных выявляется обширная потеря нейронов и вторичное воспаление. В эксперименте мыши, получавшие миноциклин, выживали после заражения штаммом JEV GP78, в отличие от не получавших лечения животных [52].

В основе патогенеза болезни Паркинсона лежит гибель дофаминергических нейронов черной субстанции, связанная с массивным астроглиозом и активацией микроглии. Апоптоз в данном случае опосредуется каспазой-3 и -8. В настоящее время эффективных методов лечения болезни Паркинсона нет, но ингибирование каспаз может замедлить ее прогрессирование и улучшить качество жизни пациентов. На модели болезни Паркинсона показано, что миноциклин снижает активацию глии

и оказывает нейропротекторное действие в черной субстанции мозга подопытных животных [53].

Таким образом, длительный аудиогенный киндлинг приводит к повышению уровня апоптоза клеток височной доли и гиппокампа у крыс КМ. Механизмы этого апоптоза носят тканеспецифический характер – в инициации гибели клеток играет роль р53-зависимый каскад (внутренний путь активации апоптоза) в височной доле и в хилусе гиппокампа, но не в зоне СА4 и гранулярном слое зубчатой извилины, где, очевидно, инициаторами апоптоза являются другие белки. По результатам исследования можно предположить, что в височной коре снижение уровня антиапоптотического белка Bcl-2 может быть одной из причин апоптоза, вызванного судорожными припадками, в то время как в подлежащем белом веществе и гиппокампе он, вероятно, не играет заметной роли. Показаны антиапоптотические и нейропротективные свойства антибиотика минолексина на модели крыс линии КМ с наследственной аудиогенной эпилепсией. Введение его приводит к снижению уровня вызванного повторяющимися судорожными припадками апоптоза нейронов во всех изученных областях головного мозга: височной коре и подлежащем белом веществе, гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа, хилусе, поле СА4. Для выяснения механизмов, лежащих в основе его действия, нами был проведен анализ экспрессии апоптоз-ассоциированных белков (р53, Bcl-2, каспаза-3, -8). Можно заключить, что в основном терапевтический эффект минолексина при длительном аудиогенном киндлинге у крыс КМ обусловлен ингибированием проапоптотического белка р53. Меньшую роль в патогенезе эпилепсии у этих крыс играет Bcl-2, о чем говорит разная реакция отделов мозга крыс на введение минолексина. Не была показана активная роль каспаз в данном эксперименте, при введении минолексина показано только снижение экспрессии каспазы-8 в белом веществе и в некоторой степени каспазы-3 в височной коре при киндлинге. Можно предположить, что при введении минолексина при длительном аудиогенном киндлинге происходит подавление как внутреннего, р53-зависимого пути апоптоза, так и внешнерецепторного.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. Д. Б., А. А. К.), сбор данных (Е. Д. Б., А. А. К., Ю. О. С., С. А. А., Е. О. Д.), обработка данных (Е. Д. Б., А. А. К., Ю. О. С., С. А. А., Е. О. Д.), написание и редактирование манускрипта (Е. Д. Б., А. А. К., Ю. О. С., Е. О. Д.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета прикладных научно-исследовательских работ по Гос. заданию Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» и при поддержке Гос. задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН 075–00264–24–00. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, протокол № 11-/2023 от 24.11.2023 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pong A, Xu K, Klein P (2023) Recent advances in pharmacotherapy for epilepsy. *Curr Opin Neurol* 36: 77–85.
<https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000001144>
2. Bazhanova E, Kozlov A (2022) Mechanisms of apoptosis in drug-resistant epilepsy. *Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova* 122: 43–50.
<https://doi.org/10.17116/jnevro202212205143>
3. Henshall D (2007) Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy. *Biochem Soc Trans* 35: 421–423.
<https://doi.org/10.1042/BST0350421>
4. Sokolova T, Zabrodskaya Y, Litovchenko A, Paramonova N, Kasumov V, Kravtsova S, Skiteva E, Sitovskaya D, Bazhanova E (2022) Relationship between Neuroglial Apoptosis and Neuroinflammation in the Epileptic Focus of the Brain and in the Blood of Patients with Drug-Resistant Epilepsy. *Int J Mol Sci* 23: 12561.
<https://doi.org/10.3390/ijms232012561>
5. Henshall D, Simon R (2005) Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1557–1572.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600149>
6. Li H, Zhang Z, Li H, Pan X, Wang Y (2023) New Insights into the Roles of p53 in Central Nervous System Diseases. *Int J Neuropsychopharmacol* 26: 465–473.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyad030>
7. Tsujimoto Y, Finger L, Yunis J, Nowell P, Croce C (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226: 1097–1099.
<https://doi.org/10.1126/science.6093263>
8. Hollville E, Romero S, Deshmukh M (2019) Apoptotic cell death regulation in neurons. *FEBS J* 286: 3276–3298.
<https://doi.org/10.1111/febs.14970>
9. Vega-García A, Orozco-Suárez S, Villa A, Rocha L, Feria-Romero I, Alonso Vanegas M, Guevara-Guzmán R (2021) Cortical expression of IL1- β , Bcl-2, Caspase-3 and 9, SEMA-3a, NT-3 and P-glycoprotein as biological markers of intrinsic severity in drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1758: 147303.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147303>
10. Eskandari E, Eaves C (2022) Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol* 221: e202201159.
<https://doi.org/10.1083/jcb.202201159>
11. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F (2010) Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 17: 1104–1114.
<https://doi.org/10.1007/s12264-012-1057-5>
12. Fritsch M, Günther S, Schwarzer R, Albert M-C, Schorn F, Werthenbach J, Schiffmann L, Stair N, Stocks H, Seeger J, Lamkanfi M, Krönke M, Pasparakis M, Kashkar H (2019) Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature* 575: 683–687.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1770-6>
13. Galvis-Alonso O, Cortes De Oliveira J, Garcia-Cairasco N (2004) Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience* 125: 787–802.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.042>
14. Abarategui B, Mai R, Sartori I, Francione S, Pelliccia V, Cossu M, Tassi L (2021) Temporal lobe epilepsy: A never-ending story. *Epilepsy Behav* 122: 108122.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108122>
15. Henning O, Heuser K, Larsen V, Kyte E, Kostov H, Marthinsen P, Egge A, Alfstad K, Nakken K (2023) Temporal lobe epilepsy. *Tidsskr Nor Laegeforen* 143.
<https://doi.org/10.4045/tidsskr.22.0369>
16. Jonas M, Cunha B (1982) Minocycline. *Ther Drug Monit* 4: 137–145.
17. Singh T, Thapliyal S, Bhatia S, Singh V, Singh M, Singh H, Kumar A, Mishra A (2022) Reconnoitering the transformative journey of minocycline from an antibiotic to an antiepileptic drug. *Life Sci* 15: 120346.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120346>
18. Костюкова АБ, Мосолов СН (2013) Нейровоспалительная гипотеза шизофрении и некоторые новые терапевтические подходы. *Московский НИИ психиатрии Минздрава РФ* 4: 8–17. [Kostyukova AB, Mosolov CH (2013) Neuroinflammatory hypothesis of schizophrenia and new therapeutical approaches. *Moscow Res Institute of Psychiatry Minzdrava Rossii* 4: 8–17. (In Russ)].

19. Singh T, Thapliyal S, Bhatia S, Singh V, Singh M, Singh H, Kumar A, Mishra A (2022) Reconnoitering the transformative journey of minocycline from an antibiotic to an antiepileptic drug. *Life Sci* 15: 120346.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120346>
20. Wang N, Mi X, Gao B, Gu J, Wang W, Zhang Y, Wang X (2015) Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience* 287: 144–156.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.021>
21. Nagarakanti S, Bishburg E (2016) Is Minocycline an Antiviral Agent? A Review of Current Literature. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 118: 4–8.
<https://doi.org/10.1111/bcpt.12444>
22. Singh S, Khanna D, Kalra S (2021) Minocycline and Doxycycline: More Than Antibiotics. *Curr Mol Pharmacol* 14: 1046–1065.
<https://doi.org/10.2174/1874467214666210210122628>
23. Бажанова Е, Козлов А, Соколова Ю (2023) Этиопатологические механизмы эпилепсии и сравнительная характеристика экспериментальных моделей аудиогенной эпилепсии. Эпилепсия и пароксизмальные состояния 15: 372–383. [Bazhanova E, Kozlov A, Sokolova J (2023) Etiopathological mechanisms of epilepsy and comparative characteristics of experimental models of audiogenic epilepsy. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya* 15: 372–383. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17749/2077-8333/epi.par.con.2023.161>
24. Горбачева ЕЛ, Куликов АА, Черниговская ЕВ, Глазова МВ, Никитина ЛС (2019) Особенности функционального состояния гипоталама-гипофизарно-адренкортикальной системы у крыс линии Крушинского – Молодкиной. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105: 150–164. [Gorbacheva EL, Kulikova AA, Chernigovskaya EV, Glazova MV, Nikitina LS (2019) Functional State of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Krushinsky–Molodkina Rats. *Russ J Physiol* 105: 150–164. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919020043>
25. Paxinos G, Watson C (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press 273.
26. Dengler C, Coulter D (2016) Normal and epilepsy-associated pathologic function of the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 226: 155–178.
<https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.04.005>
27. Nasr S, Moghimi A, Mohammad-Zadeh M, Shamsizadeh A, Noorbakhsh S (2013) The effect of minocycline on seizures induced by amygdala kindling in rats. *Seizure* 22: 670–674.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.05.005>
28. Nowak M, Strzelczyk A, Reif P, Schorlemmer K, Bauer S, Norwood B, Oertel W, Rosenow F, Strik H, Hamer H (2012). Minocycline as potent anticonvulsant in a patient with astrocytoma and drug resistant epilepsy. *Seizure* 21: 227–228.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.12.009>
29. Querol Pascual M (2007) Temporal lobe epilepsy: clinical semiology and neurophysiological studies. *Semin Ultrasound CT MR* 28: 416–423.
<https://doi.org/10.1053/j.sult.2007.09.004>
30. Alhusaini S, Whelan C, Doherty C, Delanty N, Fitzsimons M, Cavalleri G (2016) Temporal Cortex Morphology in Mesial Temporal Lobe Epilepsy Patients and Their Asymptomatic Siblings. *Cereb Cortex* 26: 1234–1241.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhu315>
31. Mizutani M, Sone D, Sano T, Kimura Y, Maikusa N, Shigemoto Y, Goto Y, Takao M, Iwasaki M, Matsuda H, Sato N, Saito Y (2021) Histopathological validation and clinical correlates of hippocampal subfield volumetry based on T2-weighted MRI in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 177: 106759.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2021.106759>
32. Schmitt A, Tatsch L, Vollhardt A, Schneider-Axmann T, Raabe F, Roell L, Heinsen H, Hof P, Falkai P, Schmitz C (2022) Decreased Oligodendrocyte Number in Hippocampal Subfield CA4 in Schizophrenia: A Replication Study. *Cells* 11: 3242.
<https://doi.org/10.3390/cells11203242>
33. Wang Y, Tian Y, Long Z, Dong D, He Q, Qiu J, Feng T, Chen H, Tahmasian M, Lei X (2024) Volume of the Dentate Gyrus/CA4 Hippocampal subfield mediates the interplay between sleep quality and depressive symptoms. *Int J Clin Health Psychol* 24: 100432.
<https://doi.org/10.1016/j.ijchp.2023.100432>
34. Shahid S, Wen Q, Risacher S, Farlow M, Unverzagt F, Apostolova L, Foroud T, Zetterberg H, Blennow K, Saykin A, Wu Y (2022) Hippocampal-subfield microstructures and their relation to plasma biomarkers in Alzheimer's disease. *Brain* 145: 2149–2160.
<https://doi.org/10.1093/brain/awac138>

35. *Stirling D, Koochesfahani K, Steeves J, Tetzlaff W* (2005) Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist* 11: 308–322.
<https://doi.org/10.1177/1073858405275175>.
36. *Naderi Y, Panahi Y, Barreto G, Sahebkar A* (2020) Neuroprotective effects of minocycline on focal cerebral ischemia injury: a systematic review. *Neural Regen Res* 15: 773–782.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.268898>
37. *He J, Mao J, Hou L, Jin S, Wang X, Ding Z, Jin Z, Guo H, Dai R* (2021) Minocycline attenuates neuronal apoptosis and improves motor function after traumatic brain injury in rats. *Exp Anim* 70: 563–569.
<https://doi.org/10.1538/expanim.21-0028>
38. *Li J, Chen J, Mo H, Chen J, Qian C, Yan F, Chi G, Hu Q, Wang L, Chen G* (2016) Minocycline Protects Against NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation and P53-Associated Apoptosis in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Mol Neurobiol* 53: 2668–2678.
<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9318-8>
39. *Kelly K, Sutton T, Weathered N, Ray N, Caldwell E, Plotkin Z, Dagher P* (2004) Minocycline inhibits apoptosis and inflammation in a rat model of ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F760–F766.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00050.2004>
40. *Xiong G, Hu T, Yang Y, Zhang H, Han M, Wang J, Jing Y, Liu H, Liao X, Liu Y* (2024) Minocycline attenuates the bilirubin-induced developmental neurotoxicity through the regulation of innate immunity and oxidative stress in zebrafish embryos. *Toxicol Appl Pharmacol* 484: 116859.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2024.116859>
41. *Ataie-Kachoe P, Pourgholami M, Bahrami-B F, Badar S, Morris D* (2015) Minocycline attenuates hypoxia-inducible factor-1 α expression correlated with modulation of p53 and AKT/mTOR/p70S6K/4E-BP1 pathway in ovarian cancer: in vitro and in vivo studies. *Am J Cancer Res* 5: 575–588.
42. *Roshanaee M, Abtahi-Eivary S, Shokoohi M, Fani M, Mahmoudian A, Moghimian M* (2022) Protective Effect of Minocycline on Bax and Bcl-2 Gene Expression, Histological Damages and Oxidative Stress Induced by Ovarian Torsion in Adult Rats. *Int J Fertil Steril* 16: 30–35.
<https://doi.org/10.22074/IJFS.2021.522550.1069>
43. *Levkovitch-Verbin H, Waserzoog Y, Vander S, Makarovsky D, Ilia P* (2014) Minocycline mechanism of neuroprotection involves the Bcl-2 gene family in optic nerve transection. *Int J Neurosci* 124: 755–761.
<https://doi.org/10.3109/00207454.2013.878340>
44. *Shokoohi M, Khaki A, Abadi A, Boukani L, Khodaie S, Kalarestaghi H, Khaki A, Moghimian M, Niazkar H, Shoorei H* (2022) Minocycline can reduce testicular apoptosis related to varicocele in male rats. *Andrologia* 54: e14375.
<https://doi.org/10.1111/and.14375>
45. *Rezaei A, Moqadami A, Khalaj-Kondori M, Feizi M* (2024) Minocycline induced apoptosis and suppressed expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the breast cancer MCF-7 cells. *Mol Biol Rep* 51: 463.
<https://doi.org/10.1007/s11033-024-09380-1>
46. *Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G* (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84: 215–222.
[https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01374-3](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01374-3)
47. *Luo Q, Wu X, Zhao P, Nan Y, Chang W, Zhu X, Su D, Liu Z* (2021) OTUD1 Activates Caspase-Independent and Caspase-Dependent Apoptosis by Promoting AIF Nuclear Translocation and MCL1 Degradation. *Adv Sci (Weinh)* 8: 2002874.
<https://doi.org/10.1002/advs.202002874>
48. *Chang C-J, Cherng C-H, Liou W-S, Liao C-L* (2005) Minocycline partially inhibits caspase-3 activation and photoreceptor degeneration after photic injury. *Ophthalmic* 37: 202–213.
<https://doi.org/10.1159/000086610>
49. *Krady J, Basu A, Allen C, Xu Y, LaNoue K, Gardner T, Levison S* (2005) Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 54: 1559–1565.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1559>
50. *Chen M, Ona V, Li M, Ferrante R, Fink K, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell L, Hersch S, Hobbs W, Vonsattel J, Cha J, Friedlander R* (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 6: 797–801.
<https://doi.org/10.1038/77528>

51. Wei X, Zhao L, Liu J, Dodel R, Farlow M, Du Y (2005) Minocycline prevents gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Neuroscience* 131: 513–521.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.014>
52. Mishra M, Basu A (2008) Minocycline neuroprotects, reduces microglial activation, inhibits caspase 3 induction, and viral replication following Japanese encephalitis. *J Neurochem* 105: 1582–1595.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05238.x>
53. Hirsch E, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel P (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* 991: 214–228.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07478.x>

Changes in The Expression of Apoptosis-Associated Proteins in the Temporal Cortex and Hippocampus of Rats During Long-Term Kindling and their Correction with Minolexin

**E. D. Bazhanova^{a, b, *}, A. A. Kozlov^b, Yu. O. Sokolova^b, A. A. Suponin^c,
and E. O. Demidova^b**

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b*The Federal State-Financed Institution Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia*

^c*Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: bazhanovae@mail.ru

Epilepsy is one of the most common and serious diseases of the brain, affecting more than 70 million people worldwide. Available anticonvulsants are able to suppress seizures in two thirds of patients, and in the remaining third of patients, epilepsy is considered drug-resistant and other types of treatment are required, such as surgery, which also does not always lead to positive results. Overcoming resistance is a complex task that requires an understanding of the biochemical pathways and general pathological processes underlying epilepsy, primarily apoptosis. The purpose of this work was to study the effect of the antibiotic minolexin on the levels of apoptosis and the expression of apoptosis-associated molecules (p53, Bcl-2, caspase-3 and caspase-8) in the temporal cortex, underlying white matter and hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats with hereditary audiogenic epilepsy with long-term kindling. Materials and methods. We used Krushinsky-Molodkina rats at the age of 11 months, which were subjected to audiogenic stimulation and administered intraperitoneally with 1 ml of saline solution or the second-generation tetracycline series minolexin at a dose of 45 mg/kg, dissolved in saline solution for 14 days. The temporal lobe cortex and underlying white matter, the hippocampus, were examined. Apoptosis levels (TUNEL) and expression of apoptosis-associated proteins (p53, Bcl-2, caspase-3 and -8) were assessed (immunohistochemistry, Western blotting). Results. In Krushinsky-Molodkina rats with hereditary audiogenic epilepsy, an increase in the apoptosis level was shown during long-term kindling. A p53-mediated, but caspase-independent mechanism of apoptosis activation has been identified. When minolexin was administered, an anti-apoptotic and neuroprotective effect was observed in the temporal lobe and hippocampus of rats.

Keywords: epilepsy, apoptosis, bcl-2, p53, caspase-3, caspase-8, minolexin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**УПРУГО-ЭЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ
И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕРВИЧНОЙ
СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ
БЛОКАДЫ P2X3-РЕЦЕПТОРА**

© 2024 г. А. С. Зеленцова¹, В. С. Шмигерева¹, Ю. В. Степенко¹,
М. Ю. Скоркина^{1,*}, А. В. Дейкин¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород,
Россия

*E-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

Поступила в редакцию 11.07.2024 г.

После доработки 09.09.2024 г.

Принята к публикации 10.09.2024 г.

P2X3-рецепторы, локализованные в гиппокампе, принимают участие в передаче возбуждения и формировании синаптической пластичности, лежащей в основе обучения и памяти. Важное значение P2X3-рецепторы имеют в возникновении нейропатической боли при эпилепсии, острой и воспалительной боли различного генеза и локализации, а также в активации и росте нервов после черепно-мозговой травмы. Целью выполненного исследования явилось изучить упруго-эластические свойства поверхности и метаболический профиль нейронов эмбриональной первичной смешанной культуры гиппокампа в условиях блокады P2X3-рецептора. Исследование выполнено на первичной смешанной культуре нейронов гиппокампа, полученной от мышей линии CD1 на 18-й день гестации (E18). В качестве блокатора P2X3-рецептора выбран высокоселективный блокатор 5-(5-йод-2-изопропил-4-метоксифеноксипиримидин-2,4-диамин монохлоридная соль. Для оценки упруго-эластических свойств нейронов измеряли модуль Юнга, характеризующий жесткость клеточной поверхности. Измерения проводили на атомно-силовом микроскопе, накладывая нагрузку в 25 локальных участках клеточной поверхности. В каждой точке регистрировали силовые кривые подвода и отвода кантилевера с последующим расчетом модуля Юнга. Метаболический профиль нейроглиальной культуры изучали в тестах Energy Phenotype на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse HS mini (США). Модуль Юнга клеточной поверхности нейронов в контроле находился в пределах от 6.8 ± 0.1 до 9.7 ± 0.2 кПа, а под действием блокатора P2X3-рецептора в диапазоне от 3.1 ± 0.1 до 8.5 ± 0.1 кПа. В условиях блокады P2X3-рецептора на 5-е сутки дифференцировки модуль Юнга клеточной поверхности был снижен на 62% ($p < 0.05$), на 8-е сутки увеличился на 22% ($p < 0.05$), а к 11-м суткам – снизился на 16.7% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Для эмбриональной культуры гиппокампа был характерен аэробный тип дыхания как в контроле, так и при блокаде P2X3-рецептора. Следовательно, блокада P2X3-рецептора не оказывала влияния на метаболический профиль культуры гиппокампа E18. Полученные данные указывают на непосредственное участие P2X3-рецептора в формировании биомеханических свойств клеточной поверхности в процессах дифференцировки и сигнальной трансдукции. Не исключено, что блокада P2X3-рецептора может быть одной из перспективных молекулярных мишеней, позволяющих снизить повреждение нейронов при травмах головного мозга, нейровоспалении, эпилепсии. Кроме того, изучение последствий

блокады P2X₃-рецептора может расширить фундаментальные представления о роли пуринергической сигнальной системы в формировании сложной морфологии нейронов на ранних стадиях развития эмбрионов.

Ключевые слова: культура нейронов гиппокампа, P2X₃-рецептор, упруго-эластические свойства нейронов, митохондриальное дыхание

DOI: 10.31857/S0869813924090142, **EDN:** AIROIJ

ВВЕДЕНИЕ

Пуринергическая сигнальная система гиппокампа задействована в процессах нейротрансмиссии [1, 2], синаптической пластичности нейронной сети [3], передаче модуляции сигналов воспаления, опосредованных рецепторами P2X [4], а также пролиферации, дифференцировки и регенерации клеток, происходящих с участием P2Y-рецепторов [5, 6]. Среди пуринергических рецепторов особый интерес представляет P2X₃, поскольку принимает участие не только в возникновении, развитии нейропатической и воспалительной боли [7–9], но и выполняет нейропротекторную роль после нарушения целостности нервного волокна [8, 10], участвуя в процессе регенерации нервных окончаний [11, 12]. Рецепторы P2X₃ экспрессируются в гиппокампе, где выявлена локализация мРНК P2X₃ в аксонах клеток зубчатой извилины, формирующих мшистые волокна, проецирующиеся на полиморфный слой зубчатой извилины и проксимальные дендриты пирамидальных клеток гиппокампа [13]. Функциональной особенностью семейства рецепторов P2X является проницаемость для Ca²⁺ при мембранном потенциале покоя [14], в отличие от ионотропных рецепторов глутамата (NMDA-каналов), вход кальция через которые происходит только при деполяризации мембраны [15]. Кроме того, известна роль P2X₃-рецептора в нейрогенезе, который на ранних стадиях развития эмбрионов может быть единственным подтипом рецептора, участвующим в быстрой возбуждающей передаче сигналов, опосредованной АТФ [16]. Известно, что в условиях ингибирования гена *P2rx3* нарушается нейрогенез гиппокампа, который сопровождается снижением пролиферации и недоразвитием нейритов в головном мозге, что было показано на мышинной модели болезни Альцгеймера [17]. Несмотря на спектр работ, посвященных различным аспектам функционирования P2X₃-рецептора, малоизученным остается вопрос о взаимосвязи рецептора с митохондриальной функцией, определяющей активность клеточного метаболизма, кальциевый гомеостаз, и, как следствие, регуляцию синаптической пластичности гиппокампа [18]. Неизученным остается вопрос о влиянии P2X₃-рецептора на биомеханические свойства клеточной поверхности, так как механическая трансдукция сигналов происходит в 40 раз быстрее, чем трансдукция биохимических сигналов в цитоплазме [19]. Целью выполненного исследования явилось изучить упруго-эластические свойства поверхности и метаболический профиль нейронов эмбриональной первичной смешанной культуры гиппокампа в условиях блокады P2X₃-рецептора.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В работе использованы мыши линии CD1 в возрасте 2 месяца массой 23–25 г. Животные были приобретены в филиале "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства" России (сертификат № 18980 от 23.05.2023). Животные содержались в условиях конвенционального вивария Белгород-

ского государственного национального исследовательского университета, искусственно регулируемого светового дня (12 ч темного и 12 ч светлого времени) при температурном режиме 22–26 °C и имели свободный доступ к корму и воде. В эксперимент были взяты 5 беременных самок, от каждой отбирали по 6 хорошо сформированных эмбрионов.

Выделение культуры гиппокампа эмбрионов мыши (E18)

В исследовании в качестве объекта выбрана эмбриональная первичная смешанная культура гиппокампа, которая является универсальной моделью для создания первичных культур с преобладающим числом нейронов над глиальными клетками. Культуры, полученные от 18-дневных эмбрионов, представляют модель дифференцированных нейронов [20]. Для получения культуры гиппокампа E18 вскрывали брюшную полость, проводили эктомию матки с эмбрионами на 18-й день гестации. Все манипуляции выполняли в чашке Петри с охлажденным раствором Хенкса на льду. Выделение гиппокампа проводили под биноклем (Leica, ув. X4). Гиппокамп делили скальпелем на 6–8 частей, переносили в пробирку с предварительно подогретым до 37 °C 0.25%-ным раствором трипсин-ЭДТА (Панэко) и помещали в инкубатор Binder (Германия) при 37 °C, 5% CO₂ на 20 мин. Клеточную суспензию трижды отмывали фосфатно-буферным раствором (PBS) с pH 7.4. К полученной суспензии добавляли 2 мл нейробазальной среды (Панэко), содержащей 2% добавки белка B-27 (НейроМакс, Панэко), 0.5 mM L-Glutamax (Gibco, 25030081), 1% ПенСтреп (ПанЭко). Для оценки упруго-эластических свойств нейронов гиппокампа первичную культуру высевали на предварительно подготовленные прокаленные стекла в концентрации 1×10^6 клеток на стекло. Общее число засеянных стекол равно десяти, по пять в опытной и контрольной группах. Для изучения метаболического профиля первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа высевали и культивировали в 8-луночных планшетах Cell Culture Miniplates (США), плотность посадки составила 2×10^5 клеток на лунку. Всего было засеяно 16 планшетов.

Оценка упруго-эластических свойств клеточной поверхности

Стекла контрольной группы инкубировали в нейробазальной среде (Панэко), содержащей 2% добавки белка B-27 (НейроМакс, Панэко), 0.5 mM L-Glutamax (Gibco, 25030081), 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко), 1% PenStrep (ПанЭко). В нейробазальную среду опытной группы добавляли высокоселективный блокатор рецептора P2X3 5-(5-йод-2-изопропил-4-метоксифенокси) пиримидин-2,4-диамин монохлоридная соль (Ro-4; Selleckchem, США, No.S0405) в конечной концентрации 12 нМ. Выбор дозы препарата основан на известной для данного лиганда концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀), которая по данным литературы составляет 3.16 нМ [21]. Смену культуральной среды проводили каждые 24 ч, блокатор постоянно находился в культуральной среде опытных проб.

Упруго-эластические свойства нейронов гиппокампа исследовали на 1-, 5-, 8-, 11- и 14-е сутки дифференцировки. Культуральную среду удаляли из лунок планшета на определенные сутки инкубации, трижды промывали PBS (pH 7.4). Затем на стекла наносили 95%-ный спирт до полного покрытия поверхности стекла и фиксировали препарат в течение 3 мин. По истечении времени фиксации препараты промывали трижды PBS, а затем ополаскивали дистиллированной водой. Сушили стекла в ламинарном шкафу и затем (через 24 ч) сканировали на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71, Зеленоград, Россия). Измерение модуля Юнга предполагает непосредственный контакт кантилевера с клеточной мембраной и его погружение в мембрану, в связи с чем клетки могут отрываться от подложки. В процессе работы был выбран

способ пробоподготовки стекол для сканирования с использованием фиксатора, учитывая, что условия подготовки препаратов в опытной и контрольной группах были одинаковыми, то фиксация в данном случае не повлияла на объективность полученных данных. Согласно экспериментальным данным исследований, представленных в доступной литературе, фиксация нейрональных клеток перед измерением модуля Юнга помогает обойти многие потенциальные проблемы, сопровождающие измерения в реальном времени, такие как проблемы с адгезией клеточного субстрата, подвижностью и поддержанием жизнеспособности нейронов во время измерения [22]. На неподвижных нейрональных клетках были проведены механические измерения в области сомы и конуса роста. Фиксированные нейроны обычно имеют значения модуля упругости порядка от 10 до сотен кПа [23, 24].

Сканирование проводили в режиме силовой спектроскопии с частотой развертки сканирования 0.6–0.8 Гц, используя кантилевер серии NSG03 (Nanoworld, США) с жесткостью 1.1 Н/м и радиусом закругления 10 нм. Механические свойства поверхности оценивали в локальных участках согласно картам локальной упругости. Для этого на клеточную поверхность сомы нейрона накладывали нагрузку в 25 локальных участках клеточной поверхности. Измерения проводили в области сомы нейрона (рис. 1).

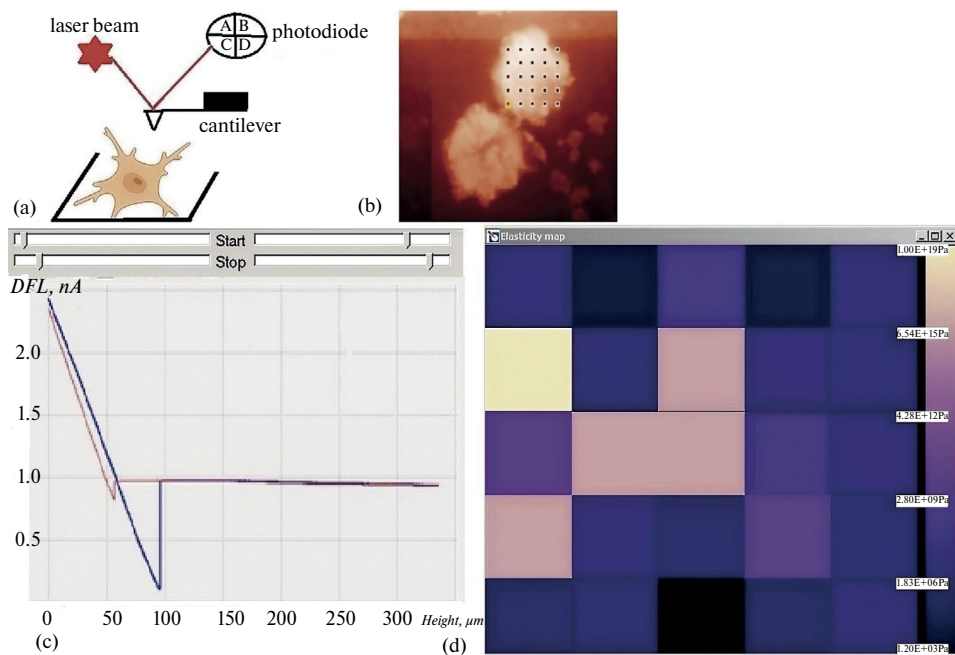


Рис. 1. Процедура атомно-силовой спектроскопии клеточной поверхности нейрона на 1-е сутки дифференцировки в культуре: (а) – принципиальная схема сканирования образца: клетка на подложке; кантилевер, который перемещается по клеточной поверхности; луч лазера настроен на гибкую консоль кантилевера, которая отклоняется при перемещении по поверхности и передает информацию на 4-секционный фотодиод, (б) – изображение нейрона, полученное при сканировании в программном обеспечении Nova с наложением нагрузки (1 нН) в 25 точках поверхности, (с) – кривые подвода (синяя) и отвода (красная) в каждой точке наложения нагрузки, по которым программное обеспечение строит карты локальной упругости, (д) – карта локальной упругости поверхности нейрона (темные участки карты указывают на высокие значения модуля Юнга, а значит и более высокую жесткость поверхности).

Алгоритм процедуры расчета модуля Юнга по силовым кривым подвода и отвода осуществляли в соответствии с ранее опубликованным способом [25]. С каждого стекла отсканировано по 20 клеток. Общее число проведенных измерений 1000.

Метаболический профиль культуры E18 гиппокампа

Оценку энергетического фенотипа нейронов проводили на 14-е сутки дифференцировки клеток в культуре с использованием набора Cell Energy Phenotype (Kit 103325–100, Agilent, США). В наборе использовали олигомицин (ингибитор АТФ-синтазы) и FCCP (митохондриальный разобщитель). Конечная концентрация стрессового раствора олигомицин/FCCP в ячейке составила 1.0/1.0 мкМ. С целью фармакологической блокады рецептора P2X3 блокатор Ro-4 вводили в опытные ячейки (B, C, D) культуральных планшетов за 24 ч до проведения измерений в конечной концентрации 12 нМ. В качестве контроля были ячейки (E, F, H) с культурой без препарата. В каждой опытной и контрольной ячейках выполнено по 3 технических измерения, в которых оценивали скорость потребления кислорода (OCR) и скорость закисления среды (ECAR). Нормализацию результатов проводили по числу клеток, подсчет клеток – после выполненного теста. По результатам измерений строили метаболические карты с помощью программного продукта Nova 1.3 (США) и Multi-File Seahorse XF Cell Energy Phenotype (США).

Статистический анализ

Результаты экспериментальных данных обработаны с использованием пакета описательной статистики Excel 10.0. В исследовании выполнена проверка гипотезы о нормальном распределении. Данные модуля Юнга приведены в виде средних значений со стандартной ошибкой, полученные результаты подвергаются нормальному распределению, в связи с чем для оценки достоверности использовали критерий Стьюдента при $p < 0.05$.

Данные по оценке метаболического профиля приведены на рисунке в виде средних значений со стандартным отклонением, результаты не подчинялись гипотезе нормального распределения, поэтому для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Манна – Уитни для выборок с ненормальным распределением. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался при $p = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модуль Юнга клеточной поверхности культуры нейронов гиппокампа E18

Модуль Юнга клеточной поверхности нейронов находился в пределах от 6.8 ± 0.1 до 9.7 ± 0.2 кПа в контроле, а под действием блокатора P2X3-рецептора диапазон изменений установлен от 3.1 ± 0.1 кПа до 8.5 ± 0.1 кПа. В условиях блокады P2X3-рецептора достоверные различия в значениях модуля Юнга установлены на 5-, 8- и 11-е сутки дифференцировки клеток в культуре (рис. 2). Так, на 5-е сутки дифференцировки в условиях блокады P2X3-рецептора модуль Юнга клеточной поверхности был снижен на 62% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. На 8-е сутки модуль Юнга под действием блокатора увеличился на 22% ($p < 0.05$), а к 11-м суткам снизился на 16.7% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

Упруго-эластические свойства клеточной поверхности нейронов изменяются в зависимости от степени дифференцировки клеток в культуре. В контрольной группе максимумы значений модуля Юнга приходятся на 5- и 11-е сутки дифференцировки клеток в культуре. В условиях блокады рецептора P2X3 максимальные значения модуля Юнга зафиксированы на 8-е сутки дифференцировки.

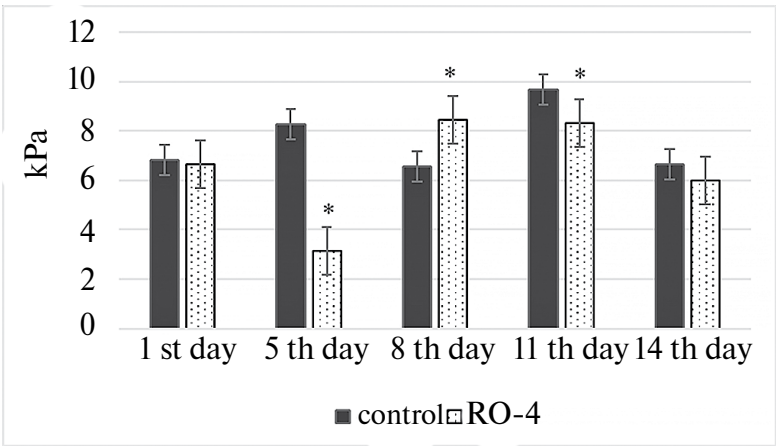


Рис. 2. Модуль Юнга клеточной поверхности первичной смешанной культуры нейронов E18 в условиях блокады P2X3 рецептора. * достоверные различия при $p < 0.05$ по критерию Стьюдента.

В выполненном исследовании проанализировано изменение модуля Юнга в 25 локальных участках клеточной поверхности нейронов отдельно в те дни дифференцировки, в которых установлены достоверные изменения данного параметра. Данные по точкам сгруппированы в зависимости от пространственной локализации, т.е. 1–6, 10–11, 15, 16, 20–25 точки отнесены к краевой зоне клетки, точки 7–9, 12–14, 17–19 – к области ядра и околоядерного пространства. Согласно полученным данным, в условиях блокады P2X3-рецептора на 5-е сутки дифференцировки установлено снижение модуля Юнга как по краю клетки, так и в области ядра соответственно на 61% ($p < 0.05$) и 64% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1. Модуль Юнга (кПА) клеточной поверхности нейронов в отдельных зонах клетки по данным карт локальной упругости

Сутки дифференцировки/группы		Краевая зона клетки	Зона в области ядра
5-е сутки	контроль	8.3 ± 0.1	8.3 ± 0.2
	блокатор Ro-4	3.2 ± 0.1*	3.0 ± 0.1*
8-е сутки	контроль	6.5 ± 0.1	6.6 ± 0.2
	блокатор Ro-4	8.4 ± 0.2*	8.5 ± 0.2*
11-е сутки	контроль	9.8 ± 0.2	9.7 ± 0.2
	блокатор Ro-4	8.4 ± 0.2*	8.2 ± 0.2*

Примечание. Данные точек наноиндентирования 1–6, 10, 11, 15, 16, 20–25 – сгруппированы в столбец "Краевая зона клетки", данные точек наноиндентирования 7–9, 12–14, 17–19 сгруппированы в столбец "Зона области ядра"; * – достоверные значения по сравнению с контролем при $p < 0.05$ по критерию Стьюдента.

На 8-е сутки дифференцировки под действием блокатора наблюдали увеличение модуля Юнга на 29% ($p < 0.05$) как по краю клетки, так и в области ядра. К 11-м суткам дифференцировки в условиях блокады P2X3-рецептора модуль Юнга был снижен на 16.6% ($p < 0.05$) по краю клетки и на 18% ($p < 0.05$) в области ядра по сравнению с контролем.

Метаболический профиль культуры E18 гиппокампа

В работе проанализировано влияние блокады P2X3-рецептора на тип клеточного метаболизма. Выделяют четыре состояния, описывающих тип клеточного метаболизма: аэробный – клетка использует преимущественно митохондриальное дыхание, гликолитический – клетка использует преимущественно гликолиз, состояние покоя – когда в клетке сведены к минимуму любые из метаболических путей, энергетический фенотип – когда клетка использует окислительное фосфорилирование и гликолиз. В выполненном исследовании изучен энергетический фенотип и построена метаболическая карта, отражающая соотношение в метаболизме культуры окислительного фосфорилирования и гликолиза в физиологических условиях и при внесении стрессоров (смеси олигомицин/FCCP) на фоне блокады P2X3-рецептора (рис. 3).

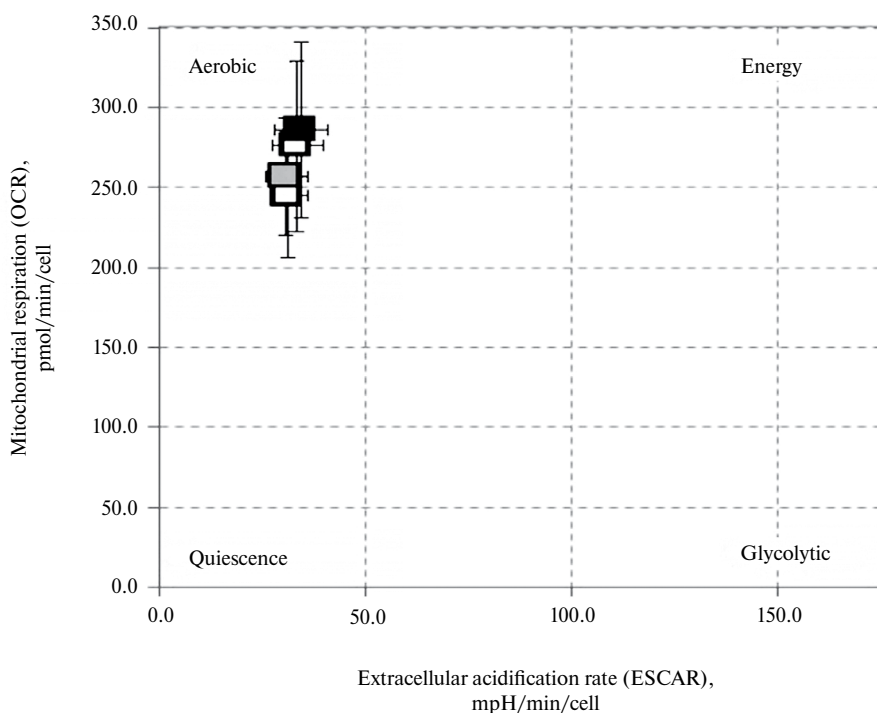


Рис. 3. Метаболическая карта энергетического фенотипа первичной смешанной культуры нейронов: обозначены области дыхания Aerobic – аэробное дыхание; Quiescence – дыхательный покой; Energy – клеточный метаболизм, основанный на смешанном дыхании (окислительное фосфорилирование и гликолиз); Glycolytic – анаэробное дыхание. Серым цветом указана контрольная группа, черным – опытная группа (блокатор Ro-4). Закрашенные квадратики обозначают дыхание до блокады цепи переноса электронов, незакрашенные квадратики означают дыхание после блокады цепи переноса электронов стрессорами.

Под влиянием блокатора рецепторов P2X3 в нейроглиальной культуре гиппокампа E18 не установлено достоверных изменений в параметрах OCR и ESCAR при введении стрессового раствора, блокирующего работу АТФ-синтазы и вызывающего разобщение митохондриального дыхания. Согласно построенной карте биоэнергетического профиля, культура сохраняла достаточно высокий тип аэробного дыхания. Следовательно, энергетический фенотип нейронов под влиянием блокатора не изменился.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании изучено влияние блокады P2X₃-рецептора на изменения упруго-эластических свойств клеточной поверхности и метаболический профиль нейронов гиппокампа. Показано, что в условиях блокады P2X₃-рецептора на 5-е и 11-е сутки дифференцировки жесткость клеточной поверхности снижается, в то время как в контроле – возрастает. Наблюдаемое изменение упруго-эластических свойств клеточной поверхности мы связываем с реорганизацией основных элементов цитоскелета нейронов – актиновых филаментов [26]. В эксперименте доказано, что повышение плотности кортикальной сети актина в подмембранном пространстве приводит к увеличению жесткости клеточной поверхности [27]. Кроме того, области высоких значений модуля Юнга в телах нейронов могут быть связаны с динамической перестройкой и высокой плотностью микротрубочек [28]. Тем не менее основным белком цитоскелета, экспрессируемым в нервной системе, выступает актин [29], он обеспечивает механические свойства клеток, рост дендритов и аксонов [30], а также участвует в транспорте белков, рецепторов и внутриклеточных везикул [31, 32]. На сенсорных нейронах спинномозгового ганглия доказано, что активация комплекса Ерас-РКС усиливает мембранную экспрессию P2X₃R, и этот эффект опосредован F-актином [33]. Однако участки взаимодействия между F-актином и P2X₃-рецептором на данный момент не идентифицированы. В качестве кандидатов, опосредованно влияющих на взаимодействие между P2X₃-рецепторами и F-актином, ученые рассматривают Ca²⁺-зависимые каналы с транзитным рецепторным потенциалом (TRPV4), которые взаимодействуют с актином и микротрубочками. Комплекс TRPV4/актин/микротрубочки взаимодействует с комплексом РКС и Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназой (CaMK) [34]. Известно, что в состоянии физиологического покоя рецептор P2X₃ связан с Ca²⁺/кальмодулин-зависимой сериновой протеинкиназой (CASK), которая контролирует закрепление его в мембране и ограничивает спонтанное высвобождение АТФ [35]. CASK содержит кальмодулин-связывающий домен с внутренней чувствительностью к Ca²⁺ [36]. При передаче сигнала может реализовываться функциональное взаимодействие между внутриклеточным Ca²⁺, CaMKII и CASK. Доказана тесная ассоциация P2X₃ с CASK, которая во многом зависит от кальциевого канала CaV2.1 и активности CaMKII [37]. CASK может также регулировать аутофосфорилирование CaMKII и синаптический рост в глутаматергических мотонейронах [36]. Не исключено, что наблюдаемое на 5-е сутки дифференцировки нейронов в культуре снижение жесткости в условиях блокады сигнального пути от рецептора P2X₃ может быть связано с отсутствием полимеризации F-актина в подмембранном пространстве.

На 8-е сутки дифференцировки в условиях блокады P2X₃-рецептора мы наблюдали увеличение жесткости клеточной поверхности. Данный факт мы связываем с протекающим в культуре глиогенезом и дифференцировкой глиальных клеток. В эксперименте по изучению упруго-эластических свойств стволовых клеток, дифференцирующихся в различные морфологические типы нейронов, было установлено снижение жесткости клеточной поверхности форм с типичной морфологией нейронов через 24 ч и в течение 240 ч дифференцировки в культуре [38]. Сoma истинных нейронов имеет низкие значения постоянной упругости, так как демонстрирует слабые взаимодействия между плазмалеммой и цитоскелетом [39]. Клетки с астроцитарным фенотипом появлялись через 72 ч в культуре, характеризовались более жесткой поверхностью за счет реорганизации актинового цитоскелета, состоящего из сформированных волокон определенного рисунка [39]. Мы полагаем, рост глиальных клеток сделал в целом первичную смешанную культуру нейронов нечувствительной к блокаде P2X₃-рецептора. В одной из экспериментальных работ была проверена гипотеза о том, что в первичных астроцитах крыс только некоторые рецепторы семейства P2 функционально связаны с увеличением концентрации внутриклеточного Ca²⁺. Показано отсутствие Ca²⁺-токов под влиянием агониста P2X₃-рецептора альфа, бета метилен-АТФ (α , β meATP) [40]. В корковых астроцитах

крыс АТФ-индуцированный кальциевый сигнал был опосредован $P2X_7$ - и $P2Y_1$ -рецепторами [41]. Следовательно, отсутствие АТФ-индуцированного Ca^{2+} -тока в глиальных клетках [42], скорее всего, не приводит к перестройке элементов цитоскелета и, как следствие, к снижению жесткости поверхности на 8-е сутки дифференцировки, что, вероятно, связано с глиогенезом и интенсивным развитием глии в культуре *in vitro*.

Блокада $P2X3$ -рецептора не оказывала влияния на метаболический профиль культуры на 14-е сутки дифференцировки. Для эмбриональной культуры гиппокампа был характерен аэробный тип дыхания как в контроле, так и при блокаде $P2X3$ -рецептора. При введении стрессора митохондриального дыхания, блокирующего работу АТФ-синтазы и разобщающего цепь переноса электронов, тип дыхания сохранился в аэробной области, но скорость потребления кислорода немного снизилась как в опытной, так и в контрольной группе. Наблюдаемый эффект является компенсаторным влиянием глиальных клеток. Согласно данным литературы, астроциты функционируют без окислительного фосфорилирования, обеспечивают GSH-зависимый защитный эффект на нейроны, являясь синтезаторами/экспортерами биоэнергетических молекул (лактат/кетонные тела) для окислительного фосфорилирования [43].

Блокада $P2X3$ -рецептора оказывает влияние на биомеханические свойства поверхности, изменяя ее жесткость. Выявленные изменения упруго-эластических свойств клеточной поверхности нейронов могут быть включены в обеспечение синаптической пластичности в гиппокампе. Роль $P2X3$ -рецепторов в гиппокампе связана с синаптической передачей и участием в краткосрочной пластичности синапсов мшистых волокон гиппокампа, обеспечивающих передачу возбуждения по цинк-чувствительным АТФ-зависимым каналам на пирамидальные клетки CA3 [44]. В stratum oriens поля CA1 гиппокампа, которая получает сигнал от холинергической септальной области, установлена локализация $P2X3$ [13], что указывает на связь данных рецепторов с никотиновыми холинорецепторами на пресинаптическом уровне для контроля чрезмерной активации норадренергических терминалей в гиппокампе [45]. Показано, что ингибирование рецепторов $P2X$ (семейства $P2X3$, $P2X4$, $P2X6$) способствует индукции феномена длительного потенцирования в клетках CA1 гиппокампа, что лежит в основе обучения и памяти [14]. При этом пуринергический синаптический вход может служить основным источником внутриклеточного Ca^{2+} вблизи потенциала покоя [46], что влияет на базальный уровень инактивации рецепторов NMDA и определяет порог индукции потенциалов действия, лежащих в основе обучения и памяти [14].

Еще одним важным аспектом выполненного исследования, требующим более детальных работ на перспективу, является изучение роли митохондрий в регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, связанного с нейрональной возбудимостью и синаптической пластичностью гиппокампа, в условиях блокады $P2X3$ -рецептора [47]. Показано, что возбудимость нейронов, связанная с чрезмерной экспрессией $P2X3$ -рецептора, играет ключевую роль в невропатической боли и повышенной возбудимости при эпилепсии [48]. Кроме того, при ноцицепции и повреждении нейронов спинного мозга ингибирование рецепторов $P2X3$ достаточно, чтобы снизить их повреждение [49]. Установленное нами отсутствие переключения метаболического фенотипа нейронов в условиях блокады $P2X3$ -рецептора не дает полного представления о функции митохондриального каскада и продукции АТФ в этих условиях. Необходимы исследования, нацеленные на изучение функционального состояния митохондриальной биоэнергетики в условиях блокады $P2X3$ -рецептора. Не исключено, что блокада $P2X3$ -рецептора при таких состояниях, как травмы головного мозга, гипоксия, эпилепсия может явиться молекулярной мишенью для снижения повреждений нейронов за счет митохондриального контроля внутриклеточного кальциевого гомеостаза. Изучение блокады $P2X3$ -рецептора может расширить фундаментальные представления о роли пуринергической сигнальной системы в формировании сложной морфофизиологии нейронов на ранних стадиях развития эмбрионов в условиях быстрой возбуждающей передачи сигналов, опосредуемой молекулой АТФ.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М. Ю. С. и А. В. Д.), сбор данных (А. С. З., В. С. Ш., Ю. В. С.), обработка данных (А. С. З., М. Ю. С., В. С. Ш., Ю. В. С.), написание и редактирование манускрипта (А. С. З., В. С. Ш., Ю. В. С., М. Ю. С., А. В. Д.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Белгородского государственного национального исследовательского университета (НИУ «БелГУ»), протокол № 01и/23 от 23.01.2023 г.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 23–24–00600). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Papp L, Balázsa T, Köfalvi A, Erdélyi F, Szabó G, Vizi ES, Sperlág B (2004) P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 3: 973–380.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.066712>
2. Rodrigues RJ, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci* 25: 6286–6295.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0628-05.2005>
3. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhratsky A (2009) P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158: 137–148.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.076>
4. Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: Pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78: 113–145.
<https://doi.org/10.1254/jjp.78.113>
5. Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240: 31–304.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)
6. Mishra SK, Braun N, Shukla V, Füllgrabe M, Schomerus C, Korf HW, Gachet C, Ikehara Y, Sévigny J, Robson SC, Zimmermann H (2006) Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* 133: 675–684.
<https://doi.org/doi:10.1242/dev.02233>
7. Brederson JD, Jarvis MF (2008) Homomeric and heteromeric P2X3 receptors in peripheral sensory neurons. *Curr Opin Investig Drugs* 9: 716–725.
8. Burnstock G (2015) Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system. *Curr Med Chem* 22: 819–844.
<https://doi.org/10.2174/0929867321666140706130415>
9. Burnstock G (2017) Purinergic signalling: therapeutic developments. *Front Pharmacol* 8: 661.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>
10. Pedata F, Dettori I, Coppi E (2016) Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology* 104: 105–130.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.007>
11. Heine C, Sygnecka K, Franke H (2016) Purines in neurite growth and astroglia activation. *Neuropharmacology* 104: 255–271.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.022>

12. Heine C, Heimrich B, Vogt J, Wegner A, Illes P, Franke H (2006) P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience* 138: 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.056>
13. Lommen J, Detken J, Harr K, von Gall C, Ali AAH (2021) Analysis of spatial and temporal distribution of purinergic P2 receptors in the mouse hippocampus. *Int J Mol Sci* 22: 8078. <https://doi.org/10.3390/ijms22158078>
14. Pankratov YI, Lalo UV, Krishnal OA (2002) Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci* 22: 8363–8369. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-19-08363.2002>
15. Lüscher C, Malenka RC (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a005710. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
16. Cheung K-K, Burnstock G (2002) Localization of P2X3 receptors and coexpression with P2X2 receptors during rat embryonic neurogenesis. *J Comp Neur* 443: 368–382. <https://doi.org/10.1002/cne.10123>
17. Gong M, Ye S, Li WX, Zhang J, Liu Y, Zhu J, Lv W, Zhang H, Wang J, Lu A, He K (2020) Regulatory function of praja ring finger ubiquitin ligase 2 mediated by the *P2rx3/P2rx7* axis in mouse hippocampal neuronal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 318: C1123–C1135. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00070.2019>
18. Devine MJ, Kittler JT (2018) Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19: 63–80. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.170>
19. Na S, Collin O, Chowdhury F, Tay B, Ouyang M, Wang Y, Wang N (2008) Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6626–6631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711704105>
20. Kaech S, Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1: 2406–2415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
21. Carter DS, Alam M, Cai H, Dillon MP, Ford APDW, Gevertz J (2009) Identification and SAR of novel diaminopyrimidines. Part 1: the discovery of RO-4, a dual P2X3/P2X2/3 antagonist for the treatment of pain. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 1628–1631. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.003>
22. Spedden E, Staii C (2013) Neuron biomechanics probed by atomic force microscopy. *Int J Mol Sci* 14: 16124–16140. <https://doi.org/10.3390/ijms140816124>
23. Jiang FX, Lin DC, Horkay F, Langrana NA (2011) Probing mechanical adaptation of neurite outgrowth on a hydrogel material using atomic force microscopy. *Ann Biomed Eng* 39: 706–713. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-0194-0>
24. Xiong Y, Lee AC, Suter DM, Lee GU (2009) Topography and nanomechanics of live neuronal growth cones analyzed by atomic force microscopy. *Biophys J* 96: 5060–5072. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.032>
25. Skorkina MY, Fedorova MZ, Sladkova EA, Muraviov AV (2012) The use of nanomechanical sensor for studies of morphofunctional properties of lymphocytes from healthy donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia. *Bull Exp Biol Med* 154: 163–166. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1899-x>
26. Lowery LA, Van Vactor D (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 332–343. <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
27. Kronlage C, Schafer-Herte M, Boning D, Oberleithner H, Fels J (2015) Feeling for filaments: quantification of the cortical actin web in live vascular endothelium *Biophys J* 109: 687–698. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.066>
28. Spedden E, White JD, Naumova EN, Kaplan DL, Staii C (2012) Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy. *Biophys J* 103: 868–877. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.08.005>
29. Coles CH, Bradke F (2015) Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Curr Biol* 25: R677–R691. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.020>
30. Pollard TD, Cooper J (2009) Actin: a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208–1212. <https://doi.org/10.1126/science.1175862>
31. Versteegen AM, Tagliatti E, Lignani G, Marte A, Stoloro T, Atias M, Corradi A, Valtorta F, Gitler D, Onofri F, Fassio A, Benfenati F (2014) Phosphorylation of synapsin I by cyclin-dependent kinase-5 sets the ratio between the resting and recycling pools of synaptic vesicles at hippocampal synapses. *J Neurosci* 34: 7266–7280. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3973-13.2014>

32. Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F (2010) The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol* 91: 313–348.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.006>.
33. Gu Y, Wang C, Li G, Huang LY (2016) EXPRESS: F-actin links Epac-PKC signaling to purinergic P2X3 receptors sensitization in dorsal root ganglia following inflammation. *Mol Pain* 12: 1744806916660557.
<https://doi.org/10.1177/1744806916660557>
34. Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T (2010) Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS One* 5: e11654.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011654>
35. Bele T, Fabbretti E (2016) The scaffold protein calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase controls ATP release in sensory ganglia upon P2X3 receptor activation and is part of an ATP keeper complex. *J Neurochem* 138: 587–597.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13680>
36. Gillespie JM, Hodge JJ (2013) CASK regulates CaMKII autophosphorylation in neuronal growth, calcium signaling, and learning. *Front Mol Neurosci* 6: 27.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00027>
37. Gnanasekaran A, Bele T, Hullugundi S, Simonetti M, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Nistri A, Fabbretti E (2013) Mutated CaV2.1 channels dysregulate CASK/P2X3 signaling in mouse trigeminal sensory neurons of R192Q Cacna1a knock-in mice. *Mol Pain* 9: 62.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-62>
38. Soares J, Araujo GRS, Santana C, Matias D, Moura-Neto V, Farina M, Frases S, Viana NB, Romão L, Nussenzveig HM, Pontes B (2020) Membrane elastic properties during neural precursor cell differentiation. *Cells* 9: 1323.
<https://doi.org/10.3390/cells9061323>
39. Pontes B, Ayala Y, Fonseca AC, Romão LF, Amaral RF, Salgado LT, Lima FR, Farina M, Viana NB, Moura-Neto V, Nussenzveig HM (2013) Membrane elastic properties and cell function. *PLoS One* 8: e67708.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067708>
40. Abbracchio MP, Ceruti S (2006) Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinerg Signal* 2: 595–604.
<https://doi.org/10.1007/s11302-006-9016-0>
41. Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonté C, Matteoli M, Verderio C, Abbracchio MP (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43: 218–223.
<https://doi.org/10.1002/glia.10248>
42. Abbracchio MP, Saffrey MJ, Hopker V, Burnstock G (1994) Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience* 59: 67–76.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90099-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90099-x)
43. Rose J, Brian C, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R (2020) Mitochondrial metabolism in astrocytes regulates brain bioenergetics. *Neurotransmission and redox balance. Front Neurosci* 14: 536682.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.536682>
44. Séguéla P, Haghghi A, Soghomonian JJ, Cooper E (1996) A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci* 16: 448–455.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-02-00448.1996>
45. Rodrigues RJ, Almeida T, Díaz-Hernández M, Marques JM, Franco R, Solsona C, Miras-Portugal MT, Ciruela F, Cunha RA (2016) Presynaptic P2X1–3 and α 3-containing nicotinic receptors assemble into functionally interacting ion channels in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 105: 241–257.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.022>
46. Cunha RA, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastião AM (1996) Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J Neurochem* 67: 2180–2187.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67052180.x>
47. Levy M, Faas GC, Saggau P, Craigen WJ, Sweatt JD (2003) Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 278: 17727–17734.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M212878200>
48. Zhou X, Ma LM, Xiong Y, Huang H, Yuan JX, Li RH, Li JN, Chen YM (2016) Upregulated P2X3 receptor expression in patients with intractable temporal lobe epilepsy and in a rat model of epilepsy. *Neurochem Res* 41: 1263–1273.
<https://doi.org/10.1007/s11064-015-1820-x>

49. Chen Y, Zhang X, Wang C, Li G, Gu Y, Huang LY (2008) Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16773–16778.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0801793105>

Elastic Properties of the Cell Surface and Metabolic Profile of an Embryonic Primary Mixed Culture of Hippocampal Neurons under Conditions of P2X3 Receptor Blockade

A. S. Zelentsova^a, V. S. Shmigerova^a, Y. V. Stepenko^a, M. Yu. Skorkina^{a, #}
and A. V. Deykin^a

^aBelgorod State National Research University, Belgorod, Russia

[#]e-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

P2X3-receptors localized in the hippocampus participate in the transmission of excitation and the formation of synaptic plasticity underlying learning and memory. P2X3-receptors are of great importance in the occurrence of neuropathic pain in epilepsy, acute and inflammatory pain of various genesis and localization as well as in the activation and growth of nerves after traumatic brain injury. The aim of the study was to study the elastic properties of the surface and the metabolic profile of neurons in an embryonic primary mixed hippocampal culture under P2X3-receptor blockade. The study was performed on a primary mixed culture of hippocampal neurons obtained from CD1 mice on the 18th day of gestation (E18). The highly selective blocker 5-(5-iodo-2-isopropyl-4-methoxyphenoxy) pyrimidine-2,4-diamine monochloride salt was selected as a P2X3-receptor blocker. To assess the elastic properties of neurons Young's modulus that characterizes the rigidity of the cell surface was measured. Measurements on an atomic force microscope applying a load in 25 local areas of the cell surface were performed. At each point, the force curves of the cantilever approach and retraction were recorded with subsequent calculation of Young's modulus. The metabolic profile of the neuroglial culture in Energy Phenotype test on a *Seahorse HS mini* cell metabolism analyzer (USA) was studied. The Young's modulus of the cell surface of neurons in the control was in the range from 6.8 ± 0.1 to 9.7 ± 0.2 kPa, and under the action of the P2X3-receptor blocker in the range from 3.1 ± 0.1 kPa to 8.5 ± 0.1 kPa. Under the conditions of P2X3-receptor blockade on the 5th day of differentiation the Young's modulus of the cell surface was reduced by 62% ($p < 0.05$), on the 8th day it increased by 22% ($p < 0.05$) and by the 11th day it decreased by 16.7% ($p < 0.05$) compared to the control. Aerobic respiration was characteristic of the embryonic hippocampal culture both in the control and with the P2X3-receptor blockade. Consequently, the blockade of the P2X3-receptor did not affect the metabolic profile of the E18 hippocampal culture. The obtained data indicate the direct participation of the P2X3-receptor in the formation of biomechanical properties of the cell surface in the processes of differentiation and signal transduction. It is possible, that the blockade of the P2X3-receptor will be one of the promising molecular targets that can reduce neuronal damage in brain injuries, neuroinflammation, hypoxia, and epilepsy. In addition, the study of the P2X3-receptor blockade can expand the fundamental understanding of the role of the purinergic signaling system in the formation of complex neuronal morphology at early stages of embryonic development under conditions of rapid excitatory signal transmission mediated by the ATP molecule.

Keywords: culture of hippocampal neurons, P2X3-receptor, elastic properties of neurons, mitochondrial respiration

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**УЧАСТИЕ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В МЕХАНИЗМАХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ
ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СЕРДЕЧНОГО РИТМА, ВЫЗВАННОГО
У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ ВВЕДЕНИЕМ ХЛОРИДА НИКЕЛЯ**

© 2024 г. С. В. Кузнецов^{1, *}, Н. Н. Кузнецова¹

¹ *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: ksv@iephb.ru

Поступила в редакцию 08.07.2024 г.
После доработки 12.08.2024 г.
Принята к публикации 11.09.2024 г.

В экспериментах на 3-дневных крысятах для выявления возможного участия адренорецепторов (АР) в развитии патологического сердечного ритма с высокоамплитудными (> 0.5 с) брадикардическими комплексами (ПСРБК), возникающего у новорожденных крыс после введения NiCl_2 , проведен сравнительный анализ изменения показателей variability сердечного ритма (ВСР), частоты сердцебиения и дыхания после инъекции NiCl_2 и высокой дозы агониста β -АР изопроterenолола. Введение NiCl_2 , блокирующего кальциевые каналы Т-типа (T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel, T-VDDC), вызывает у 100% крысят возникновение ПСРБК, сопровождающегося снижением роли нервных влияний и возрастанием роли нейрогуморальных факторов в механизмах регуляции сердечного ритма. Активация β -АР вызывает сдвиги физиологических показателей, качественно и количественно сходные с наблюдаемыми после отравления крысят NiCl_2 , но при этом ПСРБК не возникает. Фармакологический анализ с премедикацией крысят антагонистами β -АР (пропранолол, атенолол) или α -АР (фентоламин) с последующим введением NiCl_2 показал, что блокада β -АР неселективным адreno-литиком пропранололом предотвращает развитие ПСРБК у половины крысят. У животных с возникающей после инъекции NiCl_2 патологической аритмией отмечается резкое увеличение нагрузки на симпатoadреналовую систему, а также выявляется первоначальная (фоновая) неустойчивость механизмов регуляции сердечного ритма. Блокада α - и β_1 -АР не препятствует развитию ПСРБК при последующем введении NiCl_2 , что позволяет предполагать участие β_2 -АР в развитии аритмии. Введение крысятам селективного агониста β_2 -АР кленбутерола приводит к снижению ВСР, включая нейрогуморальное звено регуляции, и появлению у 22% крысят низкоамплитудных (< 0.1 с) брадикардических комплексов (БК). Полученные нами результаты в совокупности с анализом литературы позволяют полагать, что при возникновении ПСРБК в сложной совокупности изменений баланса регулирующих влияний важная роль принадлежит β -АР. Активация β_1 -АР способствует усилению выброса катехоламинов хромаффинными клетками надпочечников, возрастанию роли нейрогуморального звена регуляции сердечного ритма и вызывает активацию β_2 -АР. Блокада β_2 -АР, наоборот, снижает выброс катехоламинов и препятствует развитию патологической аритмии. Вторым необходимым фактором, приводящим к развитию аритмии с высокоамплитудными БК, является блокада кальциевых каналов Т-типа.

Ключевые слова: новорожденные крысы, дизритмия, variability сердечного ритма, кальциевые каналы, хлорид никеля, адренорецепторы

ВВЕДЕНИЕ

Ранний постнатальный онтогенез крыс характеризуется незрелостью нисходящих тормозных влияний и функциональной незрелостью вегетативной нервной системы. Это приводит к тому, что изменение баланса регуляторных влияний легко вызывает нарушения ритмической активности соматомоторной и висцеромоторной систем. При определенных условиях периодически возникающие у интактных крысят низкоамплитудные брадикардические комплексы (БК) сердечного ритма могут усиливаться, трансформируясь в патологический сердечный ритм с высокоамплитудными брадикардическими комплексами (ПСРБК) [1–3].

Кальциевые потенциал-зависимые каналы Т-типа наиболее многочисленны в узловых и эмбриональных сердечных миоцитах и участвуют в работе сердечного пейсмекера [4]. Как правило, кальциевые каналы Т-типа экспрессируются в неонатальных кардиомиоцитах, клетках синоатриального и атриовентрикулярного узла, но практически не экспрессируются во взрослых желудочковых миоцитах [5, 6]. В спонтанно сокращающихся пейсмекерных клетках увеличение субсарколеммальной внутриклеточной концентрации Ca^{2+} происходит одновременно с последней третью диастолической деполяризации из-за локального спонтанного высвобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, т.е. быстрого подъема уровня ионов Ca^{2+} (спарков). Усиление кальциевого тока Т-типа (I_{CaT}) приводит к ускорению диастолической деполяризации и усиливает входящий ток натрия-кальциевого обменника (NCX). Инактивация изоформы Cav3.1 T-VDCC вызывает умеренную брадикардию и замедление атриовентрикулярной проводимости. Все это указывает на важную роль I_{CaT} в нормальной деятельности сердечного пейсмекера, а при определенных условиях может способствовать развитию эктопических предсердных аритмий [7].

Ранее нами было установлено, что в первые две недели постнатального онтогенеза введение крысятам ингибитора ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эзерина или Ni^{2+} вызывает возникновение феноменологически сходного ПСРБК [3, 8]. Сравнительный анализ показателей variability сердечного ритма (BCP) свидетельствует о том, что нарушение механизмов регуляции сердечного ритма при отравлении крысят NiCl_2 и при активации холинореактивных структур, вызванных ингибированием АХЭ, развиваются по сходной схеме. В обоих случаях наблюдается падение общей мощности спектра периодограмм сердечного ритма и абсолютных значений мощности диапазонов LF (преимущественно симпатические с долей парасимпатических влияний) и HF (парасимпатические влияния). Значительное падение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы. Изменение баланса между нервными и нейрогуморальными факторами регуляции сердечного ритма может являться триггером для развития патологической аритмии [8]. Как увеличение выброса ацетилхолина, так и введение животным NiCl_2 может провоцировать выброс катехоламинов из хромаффинных клеток [9–11]. Нельзя исключить, что колебания уровня нейрогуморальных влияний, наблюдаемые нами у крысят при развитии дизритмии, могут быть вызваны изменением секреторной активности хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников, находящихся под модулирующим влиянием β -АР.

Активация β -АР лежит в основе положительного хронотропного эффекта, оказываемого катехоламинами на сердечный автоматизм. Катехоламины усиливают активность ионных каналов, а также внутриклеточное высвобождение Ca^{2+} [7]. Установлено, что β_1 - и β_2 -АР связываются с Gs-белками, повышая уровень внутриклеточного цАМФ, активируя таким образом инотропию и хронотропию сердца. Было показано, что β -АР принимают непосредственное участие в регуляции BCP [12]. К моменту рождения у крысы существует период потенциального вегетативного дисбаланса, когда парасимпатическая иннервация сердца установлена, но симпатическая иннервация еще не развита. В этот

период у крысят в крови циркулируют катехоламины из мозгового слоя надпочечников [13, 14]. Способность β_2 -АР связываться не только с Gs-, но и Gi-белками создает предпосылки для осуществления гибких механизмов регуляции экзотитоза катехоламинов хромаффинными клетками [15]. Таким образом, колебания уровня адренергических влияний на различные структуры незрелого организма могут вносить существенные изменения в механизмы регуляции сердечного ритма. Задачей нашего исследования стало изучение возможной роли адренореактивных структур в возникновении ПСРБК у новорожденных крысят после блокады кальциевых каналов Т-типа ионами никеля.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Работа выполнена на белых крысах *Rattus norvegicus* f. *domestica* 3-дневного возраста. Всего в опытах использовано 146 крысят с массой тела 9.2 ± 0.2 г без разделения по полу.

Экспериментальная установка и методы регистрации

Животных помещали в экранированную камеру с температурой 26 ± 0.5 °C. Контроль температуры осуществляли с помощью цифрового термометра RST-02100 (RST, Швеция). Регистрацию физиологических показателей проводили на ненаркотизированных крысятах в условиях мягкой фиксации животных. Исследовали ЭКГ и показатели внешнего дыхания. В целях снижения уровня артефактов при регистрации ЭКГ у крысят применяли нестандартное отведение от теменной части головы и крестцовой области. Для анализа частоты дыхания (ЧДД) осуществляли регистрацию экскурсии грудной клетки с использованием пьезоэлектрического датчика VP-102 (RTF, Германия). В экспериментах использовали усилители биопотенциалов ИУ-40 (производство экспериментально-производственных мастерских Института экспериментальной медицины РАМН). ЧДД регистрировали при полосе пропускания усилителя от 0.15 до 30 Гц, ЭКГ – от 5 до 150 Гц. Для ввода аналоговых сигналов в компьютер использовали АЦП E14-440 (L-card, Россия) с периодом дискретизации 1 мс. Построение периодограмм сердечного ритма и анализ регистрируемых сигналов проводили в программе «PowerGraph 3.3.12» (ООО «ДИСофт», Россия) и «Origin 2019» (OriginLab Corporation, США). Для оценки характера моторной активности расчет мощности электромиограммы (ЭМГ) проводили в «PowerGraph 3.3.12» по специальному алгоритму, выделяя ЭМГ из канала записи ЭКГ. Спектральный анализ периодограмм осуществляли по алгоритму быстрого преобразования Фурье по 32768 точкам с использованием окна Уолша (Welch). Сердечную деятельность оценивали по двум параметрам – средней частоте сердечных сокращений (ЧСС) и показателям ВСП. Анализ ВСП осуществляли, исходя из адаптированного для новорожденных крысят [1] разделения спектра периодограмм на диапазоны: VLF – 0.03–0.3 Гц; LF – 0.3–0.8 Гц; HF – 0.8–2.5 Гц. При обсуждении результатов анализа ВСП придерживались следующей классификации: диапазон VLF отражает вклад различных нейрогуморальных (церебральных эрготропных, гуморально-метаболических и др.) факторов и центральных симпатoadреналовых влияний; LF формируется преимущественно симпатическими влияниями с возможным включением и парасимпатического элемента; HF-диапазон в значительной мере является отражением дыхательной аритмии и связан преимущественно с парасимпатическими влияниями [1, 16]. При расчетах абсолютных значений мощности диапазонов VLF, LF, HF, T_0 осуществляли их нормирование (максимумы мощности индивидуальных спектров были приняты за 1 и затем усреднялись по группе). Нормированные показатели относительной мощности диапазонов VLF, LF, HF, рассчитанные в процентах от общей мощности спектра (T_0), а также значения коэффициента LF/HF и индекса централизации IC = (VLF + LF)/HF получены путем усреднения индивидуальных значений этих показателей.

Использованные фармакологические препараты

В процессе исследования было проведено 6 серий экспериментов. У интактных крысят после 15-минутного периода адаптации в течение 30 мин регистрировали сердечный и дыхательный ритм. После регистрации фоновых физиологических показателей первой группе крысят внутрибрюшинно вводили шестиводный хлористый никель (7791–20–0 Sigma-Aldrich, США) в дозе 109 мг/кг (в пересчете на безводный NiCl_2), вызывающей у 100% 3-дневных крысят однотипные изменения сердечного и дыхательного ритма. Регистрацию сердечного и дыхательного ритмов проводили в течение 30 мин. Данная эпоха анализа была выбрана, исходя из ранее полученных данных о длительности максимально выраженной реакции крысят на введение хлорида никеля [3]. Для оценки динамики развития изменений физиологических показателей (ЧСС, ВСР) 30-минутную запись разбивали на 3 фрагмента по 10 мин.

Во второй серии экспериментов осуществляли введение крысятам неселективного агониста β -АР изопроterenолола (DL-Isoproterenol hemisulfate, 6078–56–4 MP Biomedical, Германия) в дозе 600 мг/кг.

В последующих сериях экспериментов перед введением крысятам NiCl_2 проводили премедикацию одним из нижеперечисленных препаратов: неселективным блокатором β -АР пропранололом (DL-Propranolol hydrochloride, P0884 Sigma-Aldrich, США) в дозе 1 мг/кг в/бр, кардиоселективным блокатором β_1 -АР атенололом ((+/-)-Atenolol, A7655 Sigma-Aldrich, США) в дозе 10 мг/кг в/бр и неселективным блокатором α -АР фентоламином (Phentolamine methanesulfonate, P7561 Sigma-Aldrich, США) в дозе 5 мг/кг в/бр. Введение хлорида никеля проводили через 10 мин при премедикации атенололом, через 15 мин – пропранололом и через 20 мин – фентоламином. Расчеты показателей ЧДД, ЧСС и ВСР осуществляли по 10-минутным фрагментам записей, сделанным непосредственно перед инъекцией NiCl_2 . Общее время исследования каждого животного составляло от 90 до 95 мин.

В заключительной части работы была проведена серия экспериментов с внутрибрюшинной инъекцией селективного агониста β_2 -АР кленбутерола (Clenbuterol hydrochloride, C-5423 Sigma-Aldrich, США) в дозе 90 мг/кг.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных осуществляли в программе «Origin 2019». Статистически обработанные данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка ($M \pm SEM$). После проверки нормальности распределения, выполненной по критерию Шапиро – Уилка, для определения достоверности различий между группами использовали парный тест Стьюдента и в ряде случаев однофакторный дисперсионный анализ, при отсутствии нормального распределения и при анализе показателей ВСР использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Все изменения рассматривали по отношению к фоновым показателям до введения препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подробно развитие динамики нарушений сердечного и дыхательного ритма после инъекции хлорида никеля было описано нами ранее [3, 8]. Приблизительно через 3–4 мин после введения препарата у крысят возникает нарушение ритма дыхания и развитие брадикардии (табл. 1), переходящей в пачечную форму активности, при которой установившийся медленный сердечный ритм чередуется с периодами еще более медленных сердечных сокращений (рис. 1). Восстановление синусового ритма сердца и регулярно-го дыхания происходит через 15–25 мин после инъекции, но брадикардия и нарушение вагосимпатического баланса (ВСБ) сохраняются на протяжении 6–8 ч после инъекции.

Таблица 1. ЧСС и ЧДД у 3-дневных крысят до и после фармакологических воздействий

Показатели	Группа				
	Фон	Премедикация	% к фону	Препарат	% к фону
				Изопротеренол (n = 12)	
ЧСС в мин	262.3 ± 19.3	–	–	202.0 ± 14.0*	78
ЧДД в мин	84.3 ± 7.8	–	–	35.2 ± 3.1*	42
				Кленбутерол, 90 мг/кг (n = 18)	
ЧСС в мин	339.3 ± 4.9	–	–	186.0 ± 12.3*	55
ЧДД в мин	87.2 ± 3.0	–	–	50.6 ± 5.7*	58
				NiCl₂ (n = 12)	
ЧСС в мин	258.3 ± 10.9	–	–	185.8 ± 11.5*	72
ЧДД в мин	71.0 ± 4.5	–	–	37.1 ± 3.9*	52
		Пропранолол			
		с комплексами (n = 8)			
ЧСС в мин	247.0 ± 22.0	155.5 ± 11.6*	63	111.7 ± 9.7*	45
ЧДД в мин	85.9 ± 8.3	52.7 ± 2.1*	61	31.2 ± 1.9*	36
		без комплексов (n = 6)			
ЧСС в мин	271.8 ± 7.2	164.3 ± 4.5*	61	121.5 ± 3.7*	45
ЧДД в мин	74.9 ± 6.1	53.8 ± 4.3*	72	34.2 ± 2.2*	46
		Атенолол (n = 10)			
ЧСС в мин	317.2 ± 12.5	196.7 ± 3.6*	62	138.4 ± 6.9*	44
ЧДД в мин	67.7 ± 4.4	48.7 ± 2.7*	72	31.0 ± 1.6*	46
		Фентоламин (n = 8)			
ЧСС в мин	306.3 ± 9.7	244.1 ± 13.0*	80	194.1 ± 7.9*	63
ЧДД в мин	94.6 ± 7.3	79.5 ± 9.6	84	43.0 ± 4.7*	46

Примечание. Здесь и в табл. 2–8: *p < 0.05 – достоверность различий между фоном и опытом. ЧДД – частота дыхательных движений, ЧСС – частота сердечных сокращений.

Анализ ВСР показал, что после введения крысятам NiCl₂ наблюдается падение общей мощности спектра и абсолютных значений мощности диапазонов LF и HF (табл. 2, рис. 2а). Значительное снижение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы. В свою очередь, падение парасимпатических влияний приводит к смещению ВСВ в сторону усиления симпатических нервных влияний (табл. 2, рис. 2б). Учитывая, что показатель VLF, рассчитываемый за 10-минутную эпоху анализа, может показывать не только вклад гуморально-метаболических факторов, но и активность надсегментарных симпатических структур [17], мы провели оценку еще одного показателя ВСР – индекса централизации, который отражает степень преобладания недыхательных составляющих синусовой аритмии над дыхательными [16] и позволяет более полно судить о состоянии вагосимпатического баланса [18, 19]. Результаты, полученные на данной выборке животных, согласуются с полученными нами ранее и свидетельствуют о том, что изменение баланса между нервными и нейрогуморальными факторами регуляции сердечного ритма может являться триггером для развития патологической аритмии [8].

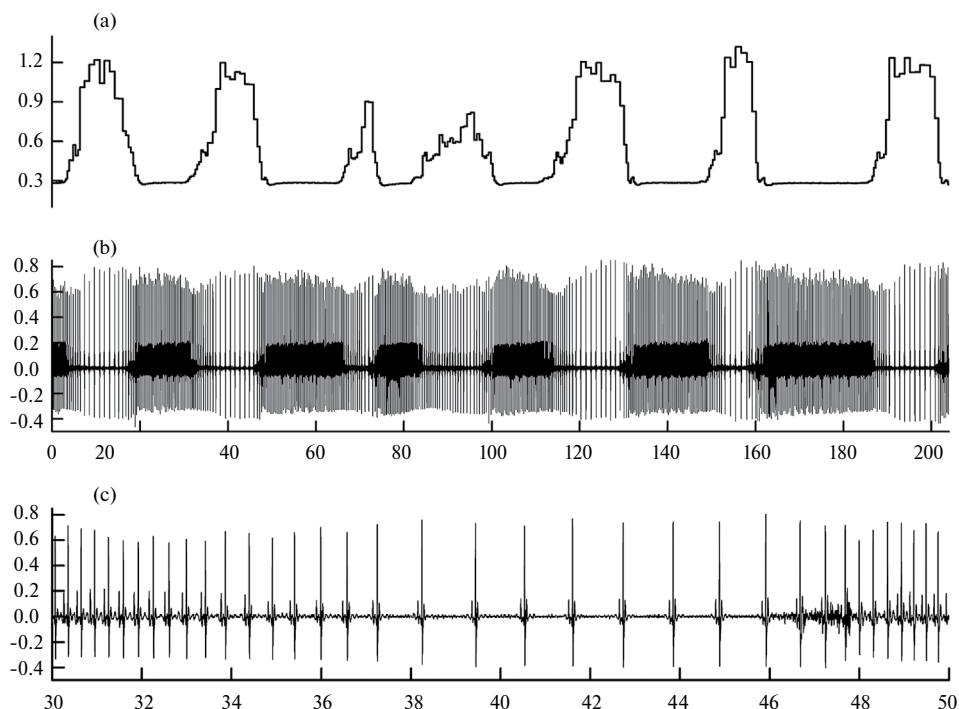


Рис. 1. Нарушения сердечного ритма у 3-дневного крысенка через 14 мин после инъекции NiCl_2 в дозе 109 мг/кг. Представлены периодограмма сердечного ритма (а), ЭКГ (б) и фрагмент записи ЭКГ с 30 по 50 с (с). По оси абсцисс – время (с), по оси ординат – амплитуда ЭКГ (мВ) и периодограммы ритма (с).

Таблица 2. Изменение показателей ВСР у 3-дневных крысят после введения NiCl_2 ($n = 12$)

Показатели	Фон	NiCl_2 , период исследования		
		0–10	10–20	20–30
VLF (y.e.)	31.16 ± 3.35	32.97 ± 3.57	30.72 ± 3.99	30.04 ± 3.44
LF (y.e.)	31.64 ± 3.63	$18.55 \pm 4.71^*$	$14.60 \pm 3.32^*$	$25.25 \pm 6.06^*$
HF (y.e.)	110.48 ± 17.53	$19.53 \pm 3.82^*$	$19.60 \pm 5.17^*$	$38.98 \pm 11.80^*$
To (y.e.)	173.27 ± 19.44	$71.05 \pm 11.65^*$	$64.92 \pm 11.77^*$	$94.27 \pm 19.35^*$
VLF, %	20.1 ± 2.8	$50.4 \pm 2.4^*$	$51.3 \pm 2.1^*$	$35.3 \pm 5.5^*$
LF, %	18.4 ± 1.2	$23.4 \pm 1.6^*$	$21.4 \pm 1.1^*$	$25.6 \pm 1.6^*$
HF, %	61.5 ± 3.1	$26.2 \pm 0.9^*$	$27.3 \pm 2.0^*$	$39.1 \pm 4.5^*$
LF/HF, y.e.	0.312 ± 0.030	$0.887 \pm 0.039^*$	$0.814 \pm 0.052^*$	$0.714 \pm 0.059^*$
IC, y.e.	0.682 ± 0.106	$2.868 \pm 0.126^*$	$2.811 \pm 0.181^*$	$1.922 \pm 0.322^*$
ЧСС в мин	262.3 ± 19.3	$188.8 \pm 19.3^*$	$140.0 \pm 18.8^*$	$166.4 \pm 13.8^*$

Здесь и в табл. 3–5, 7, 8: значения показателей VLF, LF, HF, To даны в нормированном виде (максимумы мощности индивидуальных спектров приняты за 1). Значения показателей нормированной относительной мощности диапазонов VLF, LF, HF, рассчитанных в процентах от общей мощности спектра (To), а также значения коэффициента LF/HF и индекса централизации (IC) получены путем усреднения индивидуальных значений этих показателей.

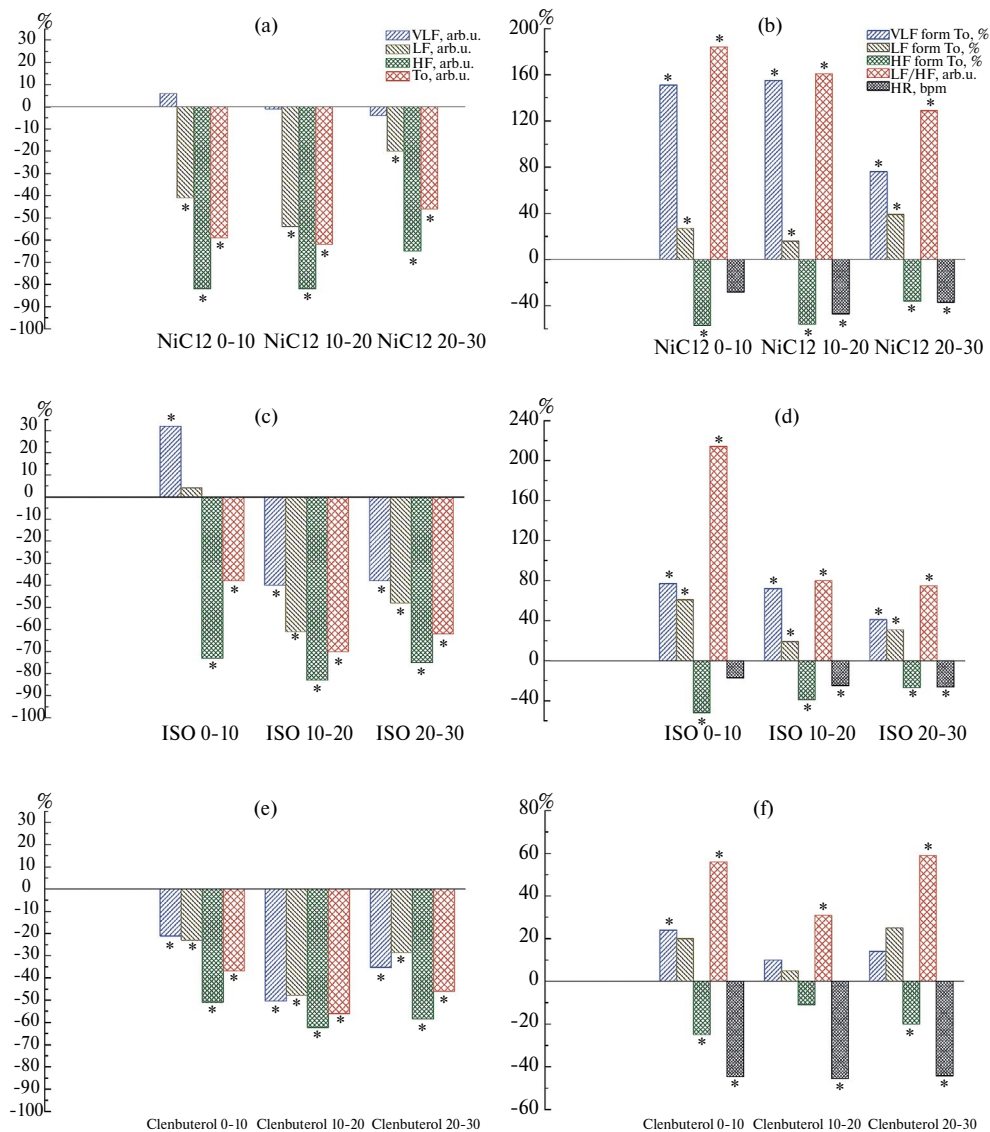


Рис. 2. Сдвиг показателей ВСП у 3-дневных крысят после инъекции NiCl₂ (а, б), изопроterenола (с, д) и кленбутерола (е, ф), представленный в % от исходного (фоновое) уровня, принятого за 100%. Значения показателей VLF, LF, HF, To (а, с, е) даны в нормированном виде (максимумы мощности индивидуальных спектров приняты за 1). Относительная мощность диапазонов VLF, LF, HF (б, д, ф) представлена в % от общей (To) мощности спектра. Коэффициент LF/HF рассчитан, исходя из усредненных индивидуальных нормированных показателей LF и HF. ЧСС (HR) представлена в уд/мин.

* $p < 0.05$ – достоверность различий между фоном и опытом, представленная на основании данных табл. 2, 3, 8.

Сравнительный анализ действия NiCl_2 и изопротеренола (ISO)

По данным литературы, LD_{50} для 1–3-дневных крысят при оральном введении ISO составляет от 610 до 1310 мг/кг [20]. Для определения эффективной дозы адrenomиметика мы провели предварительное исследование с введением препарата в дозах 2, 4, 20, 100, 200, 400, 600 и 800 мг/кг. В результате для проведения дальнейшей работы нами была выбрана доза 600 мг/кг, которая вызывает у крысят достоверные сдвиги ЧСС и ЧДД, провоцирует появление медленноволновых колебаний сердечного ритма, но не приводит к гибели животных. Оказалось, что введение ISO в дозах 2 и 4 мг/кг (у 75% крысят) сопровождается увеличением ЧСС, а в более высоких дозах – снижением. Снижение ЧСС, артериального и пульсового давления наблюдали и в экспериментах на взрослых собаках при увеличении дозы ISO до смертельной, синусовый ритм сохранялся до тех пор, пока артериальное давление не становилось менее 50 мм рт. ст., а смерть наступала от асистолии [21].

Инъекции NiCl_2 или ISO вызывали у крысят сопоставимое достоверное замедление ЧСС и ЧДД (табл. 1). Однако, если в случае NiCl_2 высокоамплитудные брадикардические комплексы возникают у 100% 3-дневных крысят, то при введении ISO только у 1 из 12 крысят были зарегистрированы БК с амплитудой в 3 раза меньше, чем после инъекции NiCl_2 . Следует отметить, что у этого животного в фоне парасимпатические влияния носили более выраженный характер ($\text{LF/HF} = 0.182$, $\text{IC} = 0.435$), чем у других крысят.

Анализ показателей ВСП после введения ISO (табл. 3) выявил изменения, качественно сходные с наблюдаемыми после инъекции NiCl_2 (рис. 2). Однако имеются и некоторые различия, касающиеся преимущественно VLF-диапазона. Более выраженное, достоверное усиление нейрогуморальных влияний, наблюдаемое в первые 10 мин после введения изопротеренола, сменяется их достоверным угнетением, в то время как после инъекции NiCl_2 абсолютная мощность данного диапазона практически не меняется (рис. 2с). Быстрое снижение мощности LF-диапазона после введения NiCl_2 отсутствует в случае адренергической активации. Соотношение представленности отдельных частотных диапазонов в общей мощности спектра периодограмм сердечного ритма изменяется сходным образом в обоих случаях (рис. 2b, d), а их количественные различия частично обусловлены отличиями ряда фоновых показателей ВСП (табл. 2, 3). Резкое увеличение индекса централизации после инъекции крысятам NiCl_2 и изопротеренола (на 369% и 348% соответственно) свидетельствует о сопоставимом уровне активации симпатoadреналовой системы.

Таблица 3. Изменение показателей ВСП у 3-дневных крысят после введения изопротеренола ($n = 12$)

Показатели	Фон	Изопротеренон, период исследования		
		0–10	10–20	20–30
VLF (y.e.)	27.88 ± 1.83	36.69 ± 4.40*	16.69 ± 1.40*	17.39 ± 1.86*
LF (y.e.)	17.42 ± 2.09	18.19 ± 1.47	6.78 ± 1.52*	9.10 ± 1.72*
HF (y.e.)	75.11 ± 16.22	20.32 ± 2.05*	12.56 ± 1.24*	19.19 ± 2.33*
To (y.e.)	120.41 ± 18.53	75.20 ± 4.66*	36.03 ± 3.00*	45.68 ± 3.92*
VLF, %	27.3 ± 6.4	48.4 ± 3.74*	46.9 ± 3.3*	38.4 ± 4.0*
LF, %	15.0 ± 1.2	24.2 ± 1.6*	17.9 ± 2.7	19.7 ± 2.2*
HF, %	57.7 ± 6.7	27.4 ± 2.9*	35.2 ± 2.3*	41.9 ± 4.2*
LF/HF, y.e.	0.295 ± 0.060	0.925 ± 0.092*	0.532 ± 0.103*	0.515 ± 0.110*
IC, y.e.	0.941 ± 0.369	2.701	1.869	1.380
ЧСС в мин	258.3 ± 10.9	215.8 ± 14.2*	193.8 ± 13.7*	190.8 ± 12.8*

Примечание. Чтобы проверить, может ли предварительная блокада адренорецепторов предотвращать развитие ПСРБК, вызванное введением NiCl_2 , мы провели ряд опытов с премедикацией крысят блокаторами α - и β -АР.

Премедикация адренолитиками

Введение крысам адреноблокаторов приводит к снижению ЧСС и ЧДД, которое продолжается и после инъекции NiCl_2 (табл. 1).

Ранее было показано, что сердце неонатальной крысы экспрессирует полностью функциональные α - и β -АР, позволяющие осуществлять хронотропный ответ при их активации. После достижения функциональной зрелости симпатической системы, хронотропные эффекты α_1 -агонистов ослабевают в пользу более взрослого β -адренергического контроля ЧСС [14, 22].

Анализ показателей ВСР, проведенный после блокады α -АР фентоламином (табл. 4), показал достоверное увеличение абсолютной мощности всех диапазонов спектра периодограмм. Увеличение мощности VLF-диапазона сохраняется и при последующем введении крысам NiCl_2 (рис. 3b). Баланс регуляторных влияний остается практически неизменным после премедикации (рис. 4b) и затем смещается характерным для действия NiCl_2 образом (рис. 4a, b). Динамика развития ПСРБК происходит по типичной для отравления NiCl_2 схеме.

Таблица 4. Изменение показателей ВСР у 3-дневных крысят после введения NiCl_2 на фоне премедикации фентоламином ($n = 8$)

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Фентоламин	NiCl_2		
			0–10	10–20	20–30
VLF (y.e.)	27.78 ± 4.27	$35.31 \pm 3.25^*$	$31.90 \pm 2.51^*$	$29.48 \pm 3.82^*$	$32.00 \pm 4.95^*$
LF (y.e.)	19.89 ± 3.80	$29.27 \pm 8.36^*$	$14.48 \pm 1.88^*$	$11.99 \pm 2.74^*$	$16.27 \pm 4.51^*$
HF (y.e.)	74.77 ± 15.37	$98.88 \pm 29.52^*$	$19.13 \pm 3.61^*$	$14.02 \pm 3.00^*$	$25.46 \pm 8.26^*$
To (y.e.)	122.44 ± 20.54	$163.45 \pm 39.17^*$	$65.51 \pm 6.54^*$	$55.49 \pm 9.49^*$	$73.73 \pm 14.83^*$
VLF, %	24.7 ± 4.1	22.1 ± 5.2	$50.2 \pm 3.0^*$	$54.6 \pm 1.5^*$	$48.2 \pm 4.9^*$
LF, %	16.2 ± 1.2	17.5 ± 1.0	$21.7 \pm 0.8^*$	$20.7 \pm 0.8^*$	$20.9 \pm 1.8^*$
HF, %	59.1 ± 5.1	54.4 ± 5.1	$28.1 \pm 2.7^*$	$24.7 \pm 0.6^*$	$30.9 \pm 5.1^*$
LF/HF, y.e.	0.311 ± 0.059	0.353 ± 0.049	$0.805 \pm 0.054^*$	$0.842 \pm 0.021^*$	$0.759 \pm 0.082^*$
IC, y.e.	0.821 ± 0.210	1.019 ± 0.279	$2.727 \pm 0.249^*$	$3.084 \pm 0.099^*$	$2.024 \pm 0.338^*$
ЧСС в мин	306.3 ± 9.7	$244.1 \pm 13.0^*$	$224.1 \pm 12.9^*$	$173.0 \pm 7.7^*$	$159.4 \pm 13.0^*$

Принимая во внимание, что в клетках синоатриального узла кальциевый ток Т-типа (I_{CaT}) может быть увеличен при β -адренергической стимуляции [23], мы провели серию экспериментов с блокадой β -АР пропранололом.

После предварительной блокады β -АР и последующим введением NiCl_2 у части животных возникает ПСРБК, а у части – он отсутствует. Анализ ВСР не выявил качественных различий показателей у крысят 1-й и 2-й подгрупп (табл. 5), за исключением разнонаправленных сдвигов мощности диапазонов VLF и LF, возникающих после премедикации. После инъекции NiCl_2 выявились количественные различия в величине сдвигов всех показателей ВСР, которые заключаются в более выраженном усилении нейрогуморальных влияний и более глубоком снижении парасимпатических влияний в подгруппе крысят с нарушениями ритма сердца (рис. 3d, e; 4d, e).

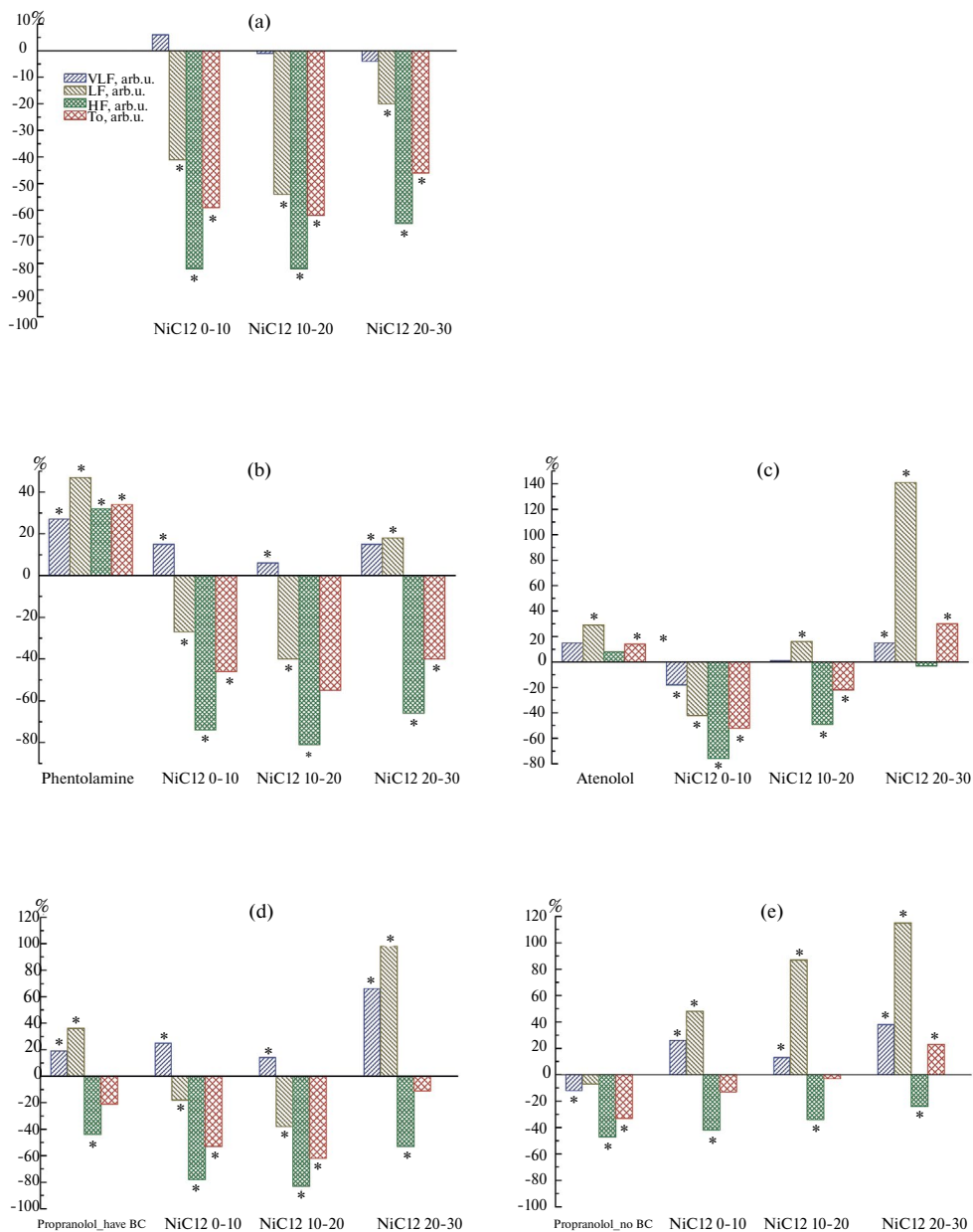


Рис. 3. Сдвиг показателей ВСП у 3-дневных крысят, представленный в % от исходного (фонового) уровня, принятого за 100%, после инъекции NiCl₂ без (а) и после премедикации животных фентоламином (б), атенололом (с) и пропранололом (д, е). Значения показателей абсолютной мощности диапазонов VLF, LF, HF, То даны в нормированном виде (максимумы мощности индивидуальных спектров приняты за 1). Здесь и на рис. 4: * $p < 0.05$ – достоверность различий между фоном и опытом, представленная на основании данных табл. 2, 4, 5, 7.

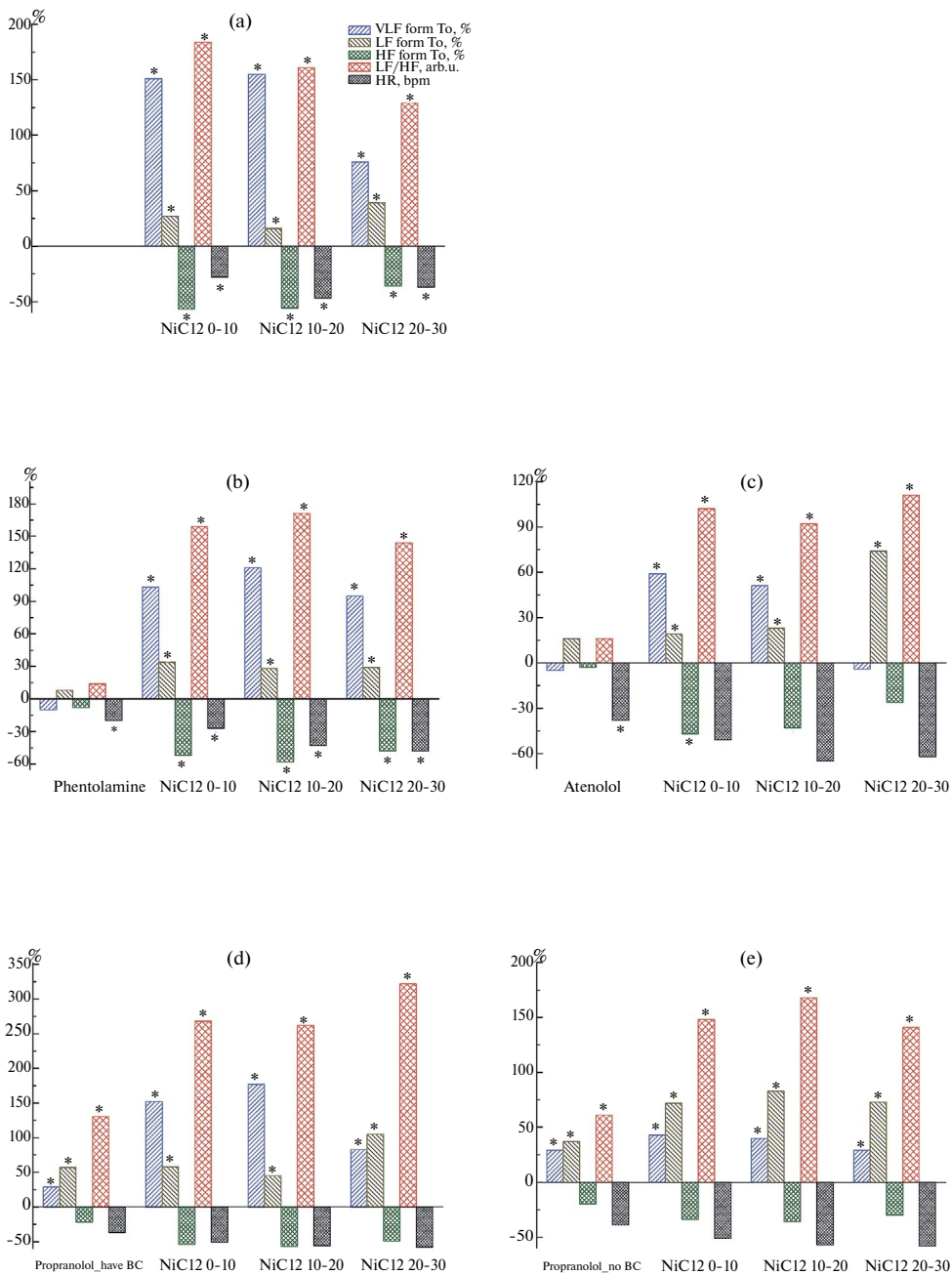


Рис. 4. Сдвиг показателей ВСР у 3-дневных крысят после фармакологических воздействий в % от исходного (фонового) уровня, принятого за 100%. Относительная мощность диапазонов VLF, LF, HF представлена в % от общей (To) мощности спектра. Коэффициент LF/HF рассчитан, исходя из усредненных индивидуальных нормированных показателей LF и HF. ЧСС (HR) представлена в уд/мин.

Таблица 5. Изменение показателей ВСП у 3-дневных крысят после введения NiCl_2 на фоне премедикации пропранололом ($n = 14$)

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Пропранолол	NiCl ₂		
			0–10	10–20	20–30
	Подгруппа 1 (n = 8) с брадикардическими комплексами				
VLF (y.e.)	27.56 ± 3.20	32.74 ± 4.90*	34.59 ± 4.33*	31.47 ± 3.33*	45.76 ± 5.36*
LF (y.e.)	36.10 ± 8.11	48.93 ± 13.19*	29.68 ± 10.81*	22.43±9.03*	71.55 ± 14.68*
HF (y.e.)	142.22 ± 34.92	80.18 ± 13.46*	31.44 ± 10.23*	24.28 ± 8.83*	66.07 ± 12.88*
To (y.e.)	205.88 ± 45.43	161.85 ± 30.80	95.71±24.77*	78.17 ± 20.72*	183.37 ± 32.49
VLF, %	16.8 ± 2.6	21.6 ± 1.3*	42.3 ± 3.9*	46.6 ± 3.5*	30.7 ± 5.1*
LF, %	17.3 ± 1.1	27.2 ± 2.8*	27.3 ± 2.2*	25.1 ± 2.1*	35.4 ± 3.3*
HF, %	65.9 ± 2.2	51.2 ± 2.6*	30.4 ± 1.8*	28.3 ± 1.5*	33.9 ± 1.9*
LF/HF, y.e.	0.244 ± 0.023	0.560 ± 0.083*	0.897 ± 0.039*	0.882 ± 0.028*	1.029 ± 0.057*
IC, y.e.	0.448 ± 0.067	0.989 ± 0.101*	2.376 ± 0.197*	2.594 ± 0.152*	2.033 ± 0.204*
ЧСС в мин	247.0 ± 22.0	155.5 ± 11.6*	122.0 ± 11.5*	108.4 ± 9.6*	104.8 ± 8.2*
	Подгруппа 2 (n = 6) без брадикардических комплексов				
VLF (y.e.)	27.19 ± 3.05	23.88 ± 1.01*	34.21 ± 3.67*	30.78 ± 4.04*	37.42 ± 6.54*
LF (y.e.)	28.36 ± 6.54	26.37 ± 4.68	41.85 ± 6.28*	53.11 ± 14.20*	61.01 ± 14.67*
HF (y.e.)	96.23 ± 18.12	51.20 ± 5.45*	55.63 ± 10.97*	63.58 ± 17.98*	72.69 ± 19.24*
To (y.e.)	151.78 ± 23.81	101.46 ± 10.26*	131.69 ± 18.44	147.48 ± 35.65	186.35 ± 42.78*
VLF, %	18.9 ± 1.69	24.4 ± 1.9*	27.1 ± 2.6*	26.5 ± 5.6*	24.3 ± 4.0*
LF, %	18.4 ± 3.2	25.2 ± 1.7*	31.7 ± 0.5*	33.7 ± 2.4*	31.9 ± 1.5*
HF, %	62.7 ± 3.3	50.4 ± 1.5*	41.2 ± 2.2*	39.8 ± 3.4*	43.8 ± 3.7*
LF/HF, y.e.	0.313 ± 0.078	0.504 ± 0.042*	0.777 ± 0.033*	0.838 ± 0.043*	0.753 ± 0.067*
IC, y.e.	0.621 ± 0.096	0.993 ± 0.063*	1.460 ± 0.127*	1.319 ± 0.134*	1.369 ± 0.202*
ЧСС в мин	271.8 ± 7.2	164.3 ± 4.5*	132.7 ± 4.5*	117.8 ± 4.1*	114.0 ± 3.8*

Наблюдаемые различия показателей ВСР после введения пропранолола и NiCl_2 у крысят 1-й и 2-й подгрупп не могут быть объяснены какими-либо значимыми различиями исходных (фоновых) показателей ВСР или особенностями их индивидуального развития (масса тела 10.0 ± 0.9 и 10.2 ± 0.6 г соответственно). Однако статистический анализ фоновых периодограмм сердечного ритма у крысят выявил ряд различий между подгруппами животных (табл. 6).

Таблица 6. Сравнительный анализ вариабельности RR-интервалов у 3-дневных крысят в фоне и после введения пропранолола

Показатели	Подгруппа 1 (с БК)			Подгруппа 2 (без БК)		
	Фон	Пропранолол	Сдвиг, %	Фон	Пропранолол	Сдвиг, %
IQR, мс	0.03 ± 0.005	$0.057 \pm 0.007^*$	90	0.02 ± 0.003	$0.033 \pm 0.003^*$	65
CoefVar, у.е.	0.063 ± 0.008	0.075 ± 0.005	19	0.051 ± 0.008	0.056 ± 0.006	10
КА, у.е.	0.232 ± 0.023	0.275 ± 0.015	19	0.221 ± 0.032	0.218 ± 0.025	–1

Примечание. IQR (Interquartile range) – интерквартильный размах; CoefVar (coefficient of variation) – коэффициент вариации; КА – коэффициент аритмии, рассчитанный по формуле $KA = (RR_{\max} - RR_{\min}) / RR_{\text{mean}}$, где RR – длительность кардиоинтервалов.

Видно, что у интактных крысят 2-й подгруппы диапазон колебаний RR-интервалов меньше и остается более устойчивым после введения пропранолола, чем у животных 1-й подгруппы. Коэффициент аритмии, сопоставимый в фоне у крысят обеих подгрупп, увеличивается у животных 1-й подгруппы после блокады адренорецепторов и практически не меняется у 2-й (табл. 6). Индекс централизации у крысят 1-й подгруппы возрастает после инъекции пропранолола на 178%, тогда как у крысят 2-й подгруппы – только на 70%. Последующее введение никеля сопровождается дальнейшим ростом индекса, который у крысят с патологической аритмией в среднем в 2.2 раза выше, чем у крысят без нарушения сердечного ритма (табл. 5). Можно полагать, что наблюдающаяся дивергенция характера реакции на инъекцию NiCl_2 связана с первоначальной неустойчивостью механизмов регуляции сердечного ритма у части крысят, а также резким увеличением нагрузки на симпатoadреналовую систему.

Так как у новорожденных крысят в миокарде имеются функционально активные β_1 - и β_2 -АР [14, 23, 24], а неселективный адренолитик пропранолол может блокировать оба типа рецепторов, вызывая в период новорожденности снижение выброса катехоламинов [25], то следующим этапом нашей работы стала премедикация крысят селективным блокатором β_1 -АР атенололом. Оказалось, что введение атенолола вызывает достоверное увеличение общей мощности спектра и абсолютной мощности диапазонов, характеризующих нервные влияния (табл. 7, рис. 3с), но не снижает уровень нейрогуморальных влияний, практически не влияет на процентное соотношение трех частотных диапазонов спектра периодограмм после инъекции NiCl_2 (рис. 4с) и не препятствует развитию ПСРБК.

Таблица 7. Изменение показателей ВСР у 3-дневных крысят после введения NiCl_2 на фоне премедикации атенололом ($n = 10$)

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Атенолол	NiCl_2		
			0–10	10–20	20–30
VLF (y.e.)	27.86 ± 2.34	31.91 ± 3.05	$22.88 \pm 1.97^*$	28.15 ± 3.49	$32.12 \pm 1.85^*$
LF (y.e.)	17.75 ± 2.86	$22.92 \pm 2.49^*$	$10.20 \pm 1.45^*$	$20.61 \pm 8.14^*$	$42.80 \pm 8.75^*$
HF (y.e.)	48.26 ± 9.12	52.16 ± 8.02	$11.49 \pm 1.42^*$	$24.79 \pm 10.30^*$	47.02 ± 9.00
To (y.e.)	93.86 ± 9.78	$106.99 \pm 11.15^*$	$44.57 \pm 4.78^*$	$73.55 \pm 21.06^*$	$121.94 \pm 17.90^*$
VLF, %	32.9 ± 4.1	31.4 ± 2.7	$52.4 \pm 1.2^*$	$49.5 \pm 4.6^*$	31.6 ± 4.6
LF, %	18.7 ± 1.8	21.7 ± 1.0	$22.2 \pm 0.8^*$	$22.9 \pm 2.3^*$	$32.5 \pm 2.3^*$
HF, %	48.4 ± 4.5	46.9 ± 3.5	$25.4 \pm 0.4^*$	$27.6 \pm 2.4^*$	$35.9 \pm 2.5^*$
LF/HF, y.e.	0.431 ± 0.067	0.499 ± 0.054	$0.871 \pm 0.024^*$	$0.826 \pm 0.032^*$	$0.910 \pm 0.037^*$
IC, y.e.	1.233 ± 0.202	1.242 ± 0.158	$2.948 \pm 0.073^*$	$2.833 \pm 0.265^*$	$1.925 \pm 0.225^*$
ЧСС в мин	317.2 ± 12.5	$196.7 \pm 3.6^*$	$155.3 \pm 10.3^*$	$109.7 \pm 8.8^*$	$119.3 \pm 7.5^*$

Учитывая установленную в наших экспериментах неэффективность премедикации крыс антагонистом β_1 -АР атенололом, можно полагать, что предотвращение развития патологической дизритмии при предварительном введении пропранолола связано с блокадой β_2 -АР. Данное предположение согласуется со сделанным ранее выводом о том, что у новорожденных крыс повышенное участие β_2 -АР в хронотропном ответе может компенсировать незрелую иннервацию сердца и сниженную эффективность β_1 -адренорецепторной сигнализации, повышая реактивность на эндогенные и экзогенные β_2 -агонисты [26].

Активация β_2 -адренорецепторов кленбутеролом

Мы установили, что блокада β_1 -АР не препятствует возникновению патологической аритмии, вызванной NiCl_2 . Для решения вопроса, может ли активация β_2 -АР провоцировать развитие ПСРБК, была проведена серия экспериментов с введением крысятам селективного β_2 -адреномиметика кленбутерола. В литературе нам не удалось найти информацию об использовании кленбутерола в экспериментах, выполненных на новорожденных крысятах в условиях *in vivo*. Острая токсичность кленбутерола для взрослых крыс при внутрибрюшинном введении составляет 70 мг/кг [27].

Для определения эффективной дозы адреномиметика мы провели предварительное исследование с введением препарата в дозах 1, 10, 20, 60, 90 и 120 мг/кг. Введение кленбутерола в дозе 1–20 мг/кг не вызывает у крысят достоверных изменений ЧСС, а в более высоких дозах приводит к развитию брадикардии (табл. 1, 8). В качестве рабочей была выбрана доза 90 мг/кг, при которой у крысят наблюдалось достоверное снижение ЧСС и в ряде случаев незначительное усиление брадикардических колебаний. Нарушения ритма дыхания, наблюдаемого при отравлении ингибиторами АХЭ или NiCl_2 , не возникало.

В первые 10 мин после инъекции у 4 из 18 крысят наблюдалось появление низкоамплитудных БК, которые совпадали с возникновением всплеск моторной активности. Следует отметить, что у этих крысят и в фоне отмечалась тенденция к замедлению сердечного ритма в момент двигательной активности (рис. 5).

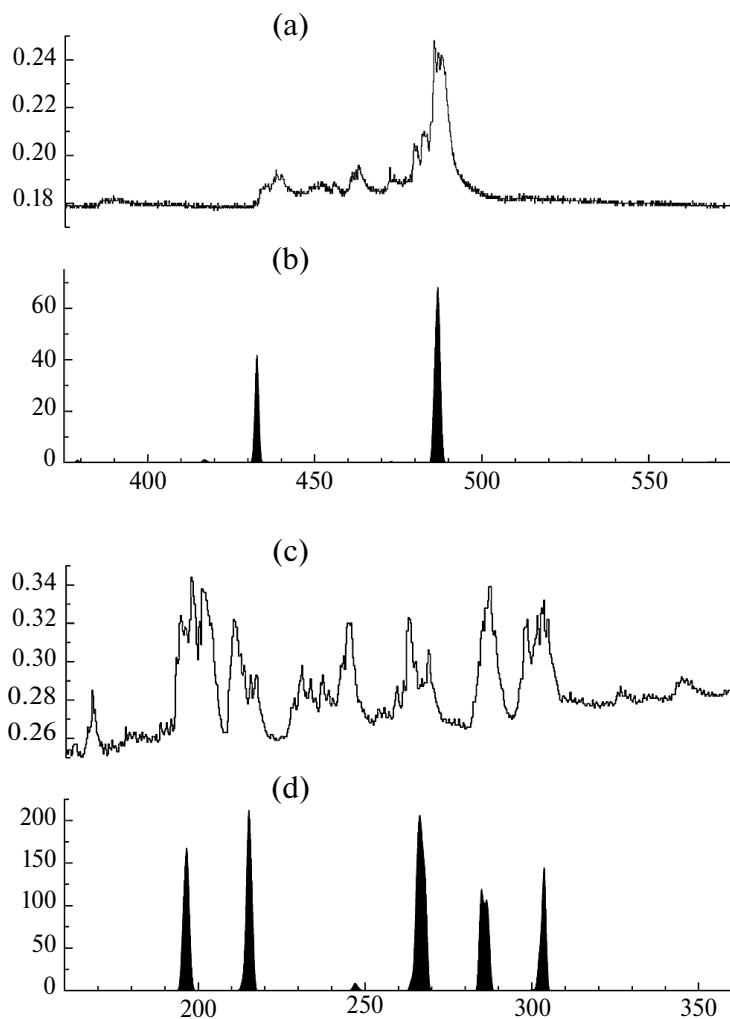


Рис. 5. Синхронизация брадикардических комплексов сердечного ритма (а) у 3-дневного крысенка со вспышками моторной активности (б) в фоне и после инъекции кленбутерола в дозе 90 мг/кг (с, d). По оси абсцисс – время в секундах, по оси ординат на (а), (с) – длительность RR-интервалов (секунды); на б, d – мощность ЭМГ ($B^2 \cdot c$).

Активация β_2 -АР вызывает снижение абсолютной мощности всех компонентов спектра периодограмм, но менее выраженное, чем после инъекции $NiCl_2$ или изопротеренола. Уменьшение нейрогуморальных влияний начинается в первые же минуты после инъекции кленбутерола и на 10–30 мин становится сопоставимым с наблюдаемым после введения изопротеренола (рис. 2е). Изменение баланса регуляторных влияний (рис. 2f) качественно не отличается от представленных на рис. 2b, d, но имеет гораздо меньшую амплитуду. Индекс централизации увеличивается максимум на 62% (табл. 8), что говорит о довольно умеренном уровне активации симпатoadреналовой системы.

Таблица 8. Изменение показателей ВСП у 3-дневных крысят после введения кленбутерола в дозе 90 мг/кг ($n = 18$)

Показатели	Фон	Кленбутерол, период исследования		
		0–10	10–20	20–30
VLF (y.e.)	34.59 ± 3.66	$27.29 \pm 3.90^*$	$17.19 \pm 2.11^*$	$22.41 \pm 4.09^*$
LF (y.e.)	19.42 ± 3.74	$14.96 \pm 3.69^*$	$10.14 \pm 2.35^*$	$13.88 \pm 3.18^*$
HF (y.e.)	57.62 ± 6.92	$28.29 \pm 9.10^*$	$21.79 \pm 5.13^*$	$23.95 \pm 9.43^*$
To (y.e.)	111.67 ± 13.36	$70.54 \pm 16.49^*$	$49.13 \pm 8.76^*$	$60.24 \pm 16.31^*$
VLF, %	32.4 ± 2.6	$40.1 \pm 2.8^*$	35.7 ± 1.5	37.0 ± 1.9
LF, %	18.6 ± 0.9	22.2 ± 2.6	19.6 ± 1.8	23.2 ± 3.2
HF, %	50.0 ± 3.7	$37.7 \pm 2.6^*$	44.7 ± 2.9	$39.8 \pm 3.4^*$
LF/HF, y.e.	0.357 ± 0.026	$0.555 \pm 0.044^*$	$0.466 \pm 0.039^*$	$0.568 \pm 0.025^*$
IC, y.e.	0.937 ± 0.173	$1.628 \pm 0.204^*$	$1.335 \pm 0.267^*$	$1.579 \pm 0.177^*$
ЧСС в мин	339.3 ± 5.0	$219.8 \pm 11.8^*$	$177.4 \pm 13.9^*$	$165.5 \pm 17.9^*$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что адреналин имеет высокое сродство к β_2 -АР, а наличие сильного β_2 -адренергического каскада у новорожденного животного предназначено для ответа на циркулирующие, а не на нейронные катехоламины. При β_1 - или β_2 -адренергической стимуляции в миоцитах возникают качественно сопоставимые реакции, в то время как во взрослом сердце β_1 - и β_2 -сигнальные трансдукционные каскады уже не идентичны. Причиной такого расхождения может быть начало функционирования ингибирующего пути, активируемого β_2 -адренергическими агонистами [14]. Инотропная и хронотропная чувствительность сердца плода и новорожденной крысы к адреналину и ISO снижается по мере того, как созревает симпатическая иннервация сердца. Возрастные различия в β -АР-опосредованном ответе могут быть обусловлены возрастным повышением эффективности связи рецептора с сигнальным путем цАМФ [28]. В нашем исследовании мы наблюдали дозо-зависимое изменение хронотропной реакции сердца на введение симпатомиметиков, что может быть связано как с взаимодействием β_2 -АР с ингибиторным Gi-белком, так и вовлечением холинореактивных структур. В электрофизиологическом исследовании, выполненном на 765 пациентах 15–85-летнего возраста, во время инфузии ISO у 7% людей было установлено возникновение парадоксальной брадикардии. Синусовая или узловая брадикардия ассоциировалась с гиперваготонией и преимущественно отмечалась у молодых (до 40 лет) пациентов. Вызванная инфузией ISO брадикардия была воспроизводимой у всех пациентов: после восстановления синусового ритма и артериального давления возобновление инфузии ISO приводило к повторной брадикардии. Наиболее вероятным объяснением является нервно-опосредованный вагусный рефлекс с гиперваготонией, вторичной по отношению к β -стимуляции [29].

Следует отметить, что снижение ЧСС и ЧДД, наблюдаемое нами в проведенном исследовании, может приводить к развитию у крысят гипоксического состояния, что, в свою очередь, будет способствовать увеличению выброса катехоламинов. Ранее в экспериментах, выполненных на тонких срезах надпочечников, было показано, что в первые 5 суток жизни крысят в ответ на острую гипоксию неонатальные хромаффинные клетки экспрессируют T-VDCC (подтип $\text{Ca}_v3.2$), которые необходимы для высвобождения катехоламинов, а селективная блокада этих каналов Ni^{2+} устраняет реакцию клеток на гипоксию. Последующее возрастное подавление экспрессии каналов $\text{Ca}_v3.2$ и снижение уровня I_{CaT} уменьшает возбудимость хромаффинных клеток и их реакцию на раздражители [30].

Существуют значительные возрастные различия не только в электрофизиологическом ответе сердца на β -адренергические агонисты, но и в степени модуляции различных ионных токов. Агонисты β_2 -АР модулируют гомеостаз кальция и сократительную способность желудочковых миоцитов. Показано, что в неонатальных клетках наблюдается тесная корреляция между активацией β_2 -АР, способствующей внутриклеточному накоплению цАМФ, и увеличением амплитуды I_{CaT} [23, 24, 31]. Эффекты, наблюдающиеся у взрослых крыс после острого воздействия NiCl_2 , вызваны комбинированным действием катехоламинов, высвобождаемых надпочечниками, и катехоламинов, высвобождаемых из эфферентных нервов [13]. Показано, что активация β -АР изопротеренолом увеличивает экспрессию T-VDCC в хромаффинных клетках взрослых крыс и способствует увеличению выброса катехоламинов [25], а введение Ni^{2+} в культуру хромаффинных клеток взрослой крысы регулирует их секреторную активность через цАМФ-рекрутированные кальциевые каналы $\text{Ca}_v3.2$ [11]. В свою очередь, уровень цАМФ, а значит и уровень секреции будет оставаться повышенным в течение длительного времени благодаря положительной обратной связи, возникающей в результате высвобождения катехоламинов и активации β_1 -АР, экспрессируемых в хромаффинных клетках [15].

Важным отличием последствий избирательной активации β_2 -АР кленбутиролом от неселективной, вызванной ISO, является достоверное снижение абсолютной мощности нейрогуморальных влияний, начинающееся с первых минут после инъекции (рис. 2). Это хорошо согласуется с результатами работы Cesetti с соавт., которые показали, что изолированные хромаффинные клетки взрослых крыс отвечают на активацию β -АР адrenomimetиком ISO либо повышением, либо понижением амплитуды токов Ca^{2+} через два различных пути модуляции: (1) PKA-опосредованный путь, связанный с β_1 -АР, и (2) – связанный с β_2 -АР и Gi/Go-белками. β_1 -АР опосредуют медленное усиление I_{CaT} в хромаффинных клетках крысы, а β_2 -АР вызывают его быстрое ингибирование в мозговом веществе надпочечников. Два кинетически и фармакологически различных пути β -адренергической сигнализации могут служить для аутокринного контроля Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза и других связанных с ним функций хромаффинных клеток крысы [15].

Спланхническая иннервация надпочечников крысы нефункциональна до конца первой недели постнатального периода. Реакция мозгового слоя надпочечников включает ненейрогенную секрецию катехоламинов, в которой ключевыми действующими лицами являются щелевые контакты и T-VDCC. Постнатальное развитие нейрогенного контроля снижает вклад щелевых соединений и T-VDCC и передает преобладающий контроль секреции катехоламинов никотиновым холинорецепторам, которые вызывают деполяризацию мембраны хромаффинных клеток и открытие высокопороговых кальциевых каналов (L, N, P/Q, R) [32, 33]. В мозговом веществе надпочечников ацетилхолин, высвобождаемый симпатическими нервами, активирует никотиновые холинорецепторы на мембране хромаффинных клеток, которые высвобождают катехоламины в кровоток [34]. Известно, что клетки надпочечников могут активироваться катехоламинами через гормональную, паракринную и/или аутокринную систему. В экспериментах на культуре ткани установлено, что ISO и агонист β_2 -АР сальбутамол стимулируют высвобождение адреналина и норадреналина из хромаффинных клеток

надпочечников человека. Блокада β_2 - и β_3 -АР ингибирует высвобождение катехоламинов, стимулированное ISO и никотином. Антагонист β_1 -АР атенолол не изменяет ни изопротеренол-, ни никотин-индуцированное высвобождение катехоламинов из хромаффинных клеток. Авторы исследования сделали вывод, что активация β_2 - и β_3 -АР модулирует базальное и вызванное высвобождение катехоламинов через аутокринную петлю положительной обратной связи в хромаффинных клетках надпочечников человека, в то время как блокада этих рецепторов не изменяет базальный выброс катехоламинов [32]. Активация β_3 -АР у взрослых крыс не вызывает изменений уровня адреналина в плазме крови [35]. Нельзя исключить, что в раннем онтогенезе блокада β -АР пропранололом или блокада Н-холинорецепторов бензогексонием [8] способствует снижению выброса адреналина из хромаффинных клеток крысят и тем самым предотвращает развитие ПСРБК.

Быстрый рост индекса централизации и отсутствие снижения мощности VLF-диапазона спектра периодограмм сердечного ритма, которые мы наблюдали после введения NiCl_2 , позволяют сделать допущение, что в условиях нашего эксперимента быстрой и эффективной блокады T-VDCC в хромаффинных клетках крысят не наблюдается. Можно полагать, что эффекты Ni^{2+} связаны с его действием на кальциевые каналы кардиомиоцитов. Следует отметить, что ионы никеля могут блокировать не только кальциевые каналы Т-типа, но и натрий-кальцевый обменник. Однако, как мы уже указывали ранее [8], для блокады NCX концентрация никеля должна быть более чем в 10 раз выше, чем для блокады T-VDCC. Используемая нами доза NiCl_2 109 мг/кг соответствует максимальному расчетному значению концентрации NiCl_2 в цельной крови 5.1 мМ (~2.3 мМ в пересчете на плазму крови), что достаточно для ингибирования Cav3.2, но недостаточно для блокады NCX.

Снижение ЧСС и ЧДД, наблюдаемое нами в проведенном исследовании, может приводить к развитию у крысят гипоксического состояния, что, в свою очередь, будет способствовать увеличению выброса катехоламинов. Ранее в экспериментах, выполненных на тонких срезах надпочечников, было показано, что в первые 5 суток жизни крысят в ответ на острую гипоксию неонатальные хромаффинные клетки экспрессируют T-VDCC (подтип Cav3.2), которые необходимы для высвобождения катехоламинов, а селективная блокада этих каналов Ni^{2+} устраняет реакцию клеток на гипоксию. Последующее возрастное подавление экспрессии каналов Cav3.2 и снижение уровня I_{CaT} уменьшает возбудимость хромаффинных клеток и их реакцию на раздражители [21, 36].

К сожалению, подавляющее большинство работ, посвященных механизмам функционального созревания рецепторного аппарата, выполнено в условиях *ex vivo* или *in vitro*, что затрудняет их использование для интерпретации данных, полученных на целом животном. Кроме того, не всегда можно сопоставлять данные, полученные на разных видах животных. Так, например, диаметрально противоположным образом происходит возрастное изменение плотности β -АР в миокарде: у крыс и собак она снижается, а у кроликов и овец – увеличивается. Несмотря на межвидовые различия, эволюционные изменения чувствительности сердца к агонистам β -АР могут существовать у всех млекопитающих в зависимости от степени созревания системы, участвующей в β -адренергической сигнализации. Существующие данные обращают внимание на возможные вредные последствия клинического применения агонистов β -АР на ранних этапах развития сердца. Нельзя исключить и отдаленные последствия ранних нарушений в работе сердечной мышцы [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения настоящего и предшествующих исследований [3, 8] установлено, что у крысят первых двух недель постнатального онтогенеза при блокаде кальциевых каналов Т-типа, повышении уровня холинергических или адренергических

регуляторных влияний могут возникать значительные нарушения ритмогенеза, приводящие к возникновению патологического сердечного ритма. Активация холинореактивных структур сопровождается падением общей мощности спектра и абсолютных значений мощности диапазонов LF и HF. Значительное падение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы. Если после премедикации Н- или М-холинолитиками мощность спектра VLF-диапазона снижается, то развития ПСРБК у крысят не происходит. Если же мощность спектра VLF-диапазона увеличивается, то в дальнейшем происходит снижение доли нервных влияний и у крысят возникает ПСРБК. В сложной совокупности изменений баланса регулирующих влияний важная роль принадлежит β -АР. Активация β_1 -АР может способствовать усилению выброса катехоламинов хромаффинными клетками надпочечников и возрастанию роли нейрогуморального звена регуляции сердечного ритма, а блокада β_2 -АР, наоборот, снижает выброс катехоламинов и препятствует развитию патологической аритмии. Вторым необходимым фактором, приводящим к развитию аритмии, является блокада кальциевых каналов Т-типа. Предварительная блокада никотиновых холинорецепторов или β_2 -АР может предотвратить возникновение ПСРБК.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

С. В. К. осуществлял планирование, сбор и обработку данных, написание статьи. Н. Н. К. осуществляла подготовку и проведение экспериментов, а также обработку данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания № 075–00264–24–00 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, протокол № 3–2/2022 от 24.03.2022 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuznetsov SV, Goncharov NV, Glashkina LM (2005) Change of parameters of functioning of the cardiovascular and respiratory systems in rats of different ages under effects of low doses of the cholinesterase inhibitor phosphacol. *J Evol Biochem Physiol* 41(2): 201–210.
<https://doi.org/10.1007/s10893-005-0055x>
2. Sizonov VA, Dmitrieva LE (2018) Heart Rhythm Disturbances Caused by Injection of Cholinesterase Inhibitor Physostigmine to Rats during the Early Ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 165(1): 44–47.
<https://doi.org/10.1007/s10517-018-4095-9>
3. Kuznetsov SV, Kuznetsova NN (2022) Effects of Ni^{2+} on Heart and Respiratory Rhythms in Newborn Rats. *J Evol Biochem Physiol* 58(5): 1367–1380.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022050088>
4. Massie BM (1997) Mibefradil: A Selective T-Type Calcium Antagonist. *Am J Cardiol* 80 (9A): 231–321.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(97\)00791-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(97)00791-1)

5. Ferron L, Capuano V, Ruchon Y, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF (2003) Angiotensin II signaling pathways mediate expression of cardiac T-type calcium channels. *Circ Res* 93: 1241–1248. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000106134.69300.B7>
6. Schaffer SW, Jong CJ (2015) Regulation of Cardiac Hypertrophy by T-Type Ca^{2+} Channel. In: T-type Calcium Channels in Basic and Clinical Science. Springer-Verlag Wien. 73–84. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1413-1>
7. Mangoni ME, Nargeot J (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88(3): 919–982. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2007>
8. Кузнецов СВ, Кузнецова НН (2023) Сравнительный анализ нарушений механизмов регуляции сердечного ритма, вызванных у новорожденных крыс хлоридом никеля и ингибитором ацетилхолинэстеразы эзеринном. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109(8): 1024–1039. [Kuznetsov SV, Kuznetsova NN (2023) Comparative Analysis of Disorders of Heart Rhythm Regulation Mechanisms Induced in Newborn Rats by Nickel Chloride and the Acetylcholinesterase Inhibitor Physostigmine (Eserine). *Russ Physiol J* 109(8): 1024–1039. (In Russ)].
9. De Diego AM, Gandía L, García AG (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)* 192(2): 287–301. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01807.x>
10. Criado M (2018) Acetylcholine nicotinic receptor subtypes in chromaffin cells. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 470: 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2050-7>
11. Giaccipoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, Carabelli V (2006) Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited $\text{CaV}3.2$ ($\alpha 1\text{H}$) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J* 90(5): 1830–1841. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071647>
12. Ecker PM, Lin CC, Powers J, Kobilka BK, Dubin AM, Bernstein D (2006) Effect of targeted deletions of $\beta 1$ - and $\beta 2$ -adrenergic-receptor subtypes on heart rate variability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(1): H192–H199. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00032.2005>
13. Alvarez C, Bladé C, Cartaña J (1993) $\alpha 2$ -adrenergic blockade prevents hyperglycemia and hepatic glutathione depletion in nickel-injected rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 121(1): 112–117. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1135>
14. Robinson RB (1996) Autonomic receptor – effector coupling during post-natal development. *Cardiovasc Res* 31(Issue suppl): E68–E76. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(95\)00151-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(95)00151-4)
15. Cesetti T, Hernández-Guijo JM, Baldelli P, Carabelli V, Carbone E (2003) Opposite action of $\beta 1$ - and $\beta 2$ -adrenergic receptors on $\text{Ca(V)}1$ L-channel current in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 23(1): 73–83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00073.2003>
16. Baevsky RM, Chernikova AG (2017) Heart rate variability analysis: physiological foundations and main methods. *Cardiometry* 10: 66–76. <https://doi.org/10.12710/CARDIOMETRY.2017.10.6676>
17. Altimiras J (1999) Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? *Comp Biochem Physiol. A Mol Integr Physiol* 124(4): 447–460. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00137-3](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00137-3)
18. Diveky T, Prasko J, Kamaradova D, Grambal A, Latalova K, Silhan P, Obereigneru R, Salinger J, Opavsky J, Tonhajzerova I (2013) Comparison of heart rate variability in patients with panic disorder during cognitive behavioral therapy program. *Psychiatria Danubina* 25(1): 62–67.
19. Kuznetsov SV, Kuznetsova NN (2016) Application of Cortexin for Correcting the Consequences of Hypoxic-Ischemic Damage in the Brain of Infant Rats. *J Evol Biochem Physiol* 52(3): 217–227. <https://doi.org/10.1134/S0022093016030042>
20. Goldenthal EI (1971) A compilation of LD50 values in newborn and adult animals. *Toxicol Appl Pharmacol* 18(1): 185–207. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(71\)90328-0](https://doi.org/10.1016/0041-008x(71)90328-0)
21. Collins JM, McDevitt DG, Shanks RG, Swanton JG (1969) The cardio-toxicity of isoprenaline during hypoxia. *Br J Pharmacol* 36(1): 35–45. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1969.tb08301.x>
22. Natarajan AR, Rong Q, Katchman AN, Ebert SN (2004) Intrinsic cardiac catecholamines help maintain beating activity in neonatal rat cardiomyocyte cultures. *Pediatr Res* 56(3): 411–417. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000136279.80897.4C>

23. Li Y, Zhang X, Zhang C, Zhang X, Li Y, Qi Z, Szeto C, Tang M, Peng Y, Molkentin JD, Houser SR, Xie M, Chen X (2018) Increasing T-type calcium channel activity by β -adrenergic stimulation contributes to β -adrenergic regulation of heart rates. *J Physiol* 596(7): 1137–1151. <https://doi.org/10.1113/JP274756>
24. Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB, Steinberg SF (1995) Beta2-adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 76(1): 40–52. <https://doi.org/10.1161/01.res.76.1.40>
25. Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Gancippoli A, Carbone E (2004) Exposure to cAMP and β -adrenergic stimulation recruits Ca_v3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol* 558(Pt 2): 433–449. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.061184>
26. Oliveira ES, Pereira AH, Cardoso AC, Franchini KG, Bassani JWM, Bassani RA (2015) Atrial chronotropic reactivity to catecholamines in neonatal rats: Contribution of β -adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 64: 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.031>
27. Woodward KN Clenbuterol (WHO Food Additives Series 38). Adrenoceptor agonists. Clenbuterol. <https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v38je02.htm>
28. Ostadal B, Parizek A, Ostadalova I, Kolar F (2018) Cardiotoxicity of β -mimetic catecholamines during ontogenetic development – possible risks of antenatal therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 96(7): 639–646. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0774>
29. Brembilla-Perrot B, Muhanna I, Nippert M, Popovic B, Beurrier D, Houriez P, Terrier de la Chaise A, Claudon O, Louis P, Abdelaal A, State S, Andronache M, Suty-Selton C (2005) Paradoxical effect of isoprenaline infusion. *Europace* 7(6): 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.eupc.2005.06.012>
30. Levitsky KL, López-Barneo J (2009) Developmental change of T-type Ca^{2+} channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia. *J Physiol* 587(Pt 9): 1917–1929. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.168989>
31. Tanaka H, Shigenobu K (1990) Role of beta-adrenoceptor-adenylate cyclase system in the developmental decrease in sensitivity to isoprenaline in foetal and neonatal rat heart. *Br J Pharmacol* 100(1): 138–142. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb12065.x>
32. Cortez V, Santana M, Marques AP, Mota A, Rosmaninho-Salgado J, Cavadas C (2012) Regulation of catecholamine release in human adrenal chromaffin cells by β -adrenoceptors. *Neurochem Int* 60(4): 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.018>
33. Guérineau NC, Desarménien MG, Carabelli V, Carbone E (2012) Functional chromaffin cell plasticity in response to stress: focus on nicotinic, gap junction, and voltage-gated Ca^{2+} channels. *J Mol Neurosci* 48(2): 368–386. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9707-7>
34. Nagayama T, Matsumoto T, Kuwakubo F, Fukushima Y, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Kimura T, Satoh S (1999) Role of calcium channels in catecholamine secretion in the rat adrenal gland. *J Physiol* 520(2): 503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00503.x>
35. Berg T (2014) β 3-adrenoceptors inhibit stimulated norepinephrine release in spontaneously hypertensive rats. *Front Physiol* 5: 499. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00499>
36. Carbone E, Borges R, Eiden LE, García AG, Hernández-Cruz A (2019) Chromaffin Cells of the Adrenal Medulla: Physiology, Pharmacology and Disease. *Compr Physiol* 9(4): 1443–1502. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190003>

Participation of Adrenoreceptors in the Mechanisms of Pathologic Cardiac Rhythm Induced in Newborn Rats by Nickel Chloride Administration

S. V. Kuznetsov^{a, #}, and N. N. Kuznetsova^a

*^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences,
Saint Petersburg, Russia
#e-mail: ksv@iephb.ru*

In experiments on 3-day-old rats to identify the possible involvement of adrenoreceptors (AR) in the development of pathologic heart rhythm with high-amplitude (> 0.5 c) bradycardic complexes (PHRBC) occurring in newborn rats after NiCl_2 administration, a comparative analysis of changes in heart rate variability (HRV), heart rate, and respiration after injection of nickel chloride and a high dose of the β -AR agonist isoproterenol was carried out. Injection of NiCl_2 , which blocks T-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (T-VGCC), causes in 100% of rats the occurrence of PHRBC accompanied by a decrease in the role of neural influences and an increase in the role of neurohumoral factors in the mechanisms of heart rate regulation. Activation of β -AR causes shifts of physiological parameters qualitatively and quantitatively similar to those observed after NiCl_2 poisoning in rats, but PHRBC does not occur. Pharmacological analysis with premedication of rats with β -AR antagonists (propranolol, atenolol) or α -AR antagonists (phentolamine) followed by NiCl_2 administration showed that β -AR blockade with the nonselective adrenolytic propranolol prevents the development of PSRBC in half of the rats. In animals with pathologic arrhythmia occurring after NiCl_2 injection, a rapid increase in the load on the sympathoadrenal system is noted, and the initial (background) instability of the mechanisms of heart rhythm regulation is revealed. Blockade of α - and β_1 -AR does not prevent the development of PHRBC during subsequent NiCl_2 administration, which suggests the participation of β_2 -AR in the development of arrhythmia. Administration of the selective β_2 -AR agonist clenbuterol to rats leads to a decrease in HRV, including neurohumoral regulation and the appearance of low-amplitude (< 0.1 c) bradycardic complexes (BC) in 22% of rats. The results obtained by us together with the analysis of the literature suggest that β -AR plays an important role in the complex changes in the balance of regulatory influences in the occurrence of PHRBCs. Activation of β_1 -AR contributes to increased release of catecholamines by adrenal chromaffin cells, increased role of neurohumoral component of heart rhythm regulation and causes activation of β_2 -AR. Blockade of β_2 -AR, on the contrary, reduces the release of catecholamines and prevents the development of pathological arrhythmia. The second necessary factor leading to the development of arrhythmias with high-amplitude BCs is blockade of T-type calcium channels.

Keywords: newborn rats, dysrhythmia, heart rate variability, calcium channels, nickel chloride, adrenoreceptors

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ И ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ
НА АКТИВНОСТЬ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-
АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ, БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
И ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ПОСЛЕ УЛЬЦЕРОГЕННОГО СТРЕССОРА**

© 2024 г. Н. И. Ярушкина¹*, М. Ю. Зенько¹, О. Ю. Морозова¹, О. П. Комкова¹,
К. А. Баранова¹, С. Е. Жуйкова¹, Е. А. Рыбникова¹, Л. П. Филаретова¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: yarushkinani@infran.ru

Поступила в редакцию 13.09.2024 г.

После доработки 02.10.2024 г.

Принята к публикации 03.10.2024 г.

Полученные нами ранее результаты свидетельствуют о возможности корректирующих эффектов негативных последствий социальной изоляции на функционирование организма с помощью обогащенной среды. Задача настоящей работы заключалась в изучении влияния условий содержания крыс – стандартных условий, социальной изоляции и обогащенной среды – на стресс-реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренортикальной системы (ГТАКС), болевую чувствительность и поведение крыс после действия ulcerogenic stressor. Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Спрейг-Дуоли. Крысят 30-дневного возраста после отъема от матери помещали на 4 недели в разные условия содержания: стандартные условия (СУ), изоляцию (СИ) или обогащенную среду (ОС). Через 4 недели крыс каждой группы подвергали действию ulcerogenic stressor (УС): 3 ч иммобилизации при холоде (10 °С). Начиная со следующего после действия УС дня, в течение недели у всех групп крыс последовательно оценивали соматическую болевую чувствительность (в тесте «горячей пластины»), поведение (в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт») и стресс-реактивность ГТАКС (по уровню кортикостерона в крови в ответ на слабый процедурный стрессор). Согласно полученным результатам, содержание крыс в условиях СИ в наших экспериментах приводило к более быстрому увеличению массы их тела с увеличением возраста, повышению уровня тревожности, появлению депрессивноподобных реакций у половины исследованных животных, увеличению чувствительности к болевому воздействию. В то же время крысы, содержавшиеся в ОС, отличались повышенной стресс-реактивностью ГТАКС, большей моторной и исследовательской активностью, меньшей тревожностью и меньшей чувствительностью к болевому воздействию. Полученные результаты представляют новые аргументы в пользу ранее сделанного нами заключения о том, что СИ крыс оказывает дезадаптивное влияние на общее функциональное состояние организма, а ОС, напротив, приводит к адаптивным изменениям. Проведенное исследование акцентирует внимание на важности интегративного подхода при исследовании эффектов СИ и ОС на организм.

Ключевые слова: социальная изоляция, обогащенная среда, стресс, глюкокортикоидные гормоны, стресс-реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренортикальной системы, эрозия желудка, поведение, болевая чувствительность

DOI: 10.31857/S0869813924090162, EDN: A1OKOL

ВВЕДЕНИЕ

Социальная изоляция (недостаточный уровень социальных контактов с окружающими, объективное ощущение одиночества) и одиночество (субъективное ощущение) – явления мирового масштаба [1]. Высокий уровень социальной изоляции и одиночества приводит к серьезным негативным последствиям для здоровья населения. Многочисленные исследования демонстрируют негативные эффекты социальной изоляции на различные аспекты здоровья, включающие как психическое, так и физическое благополучие [2–5]. Люди, не имеющие достаточно прочных социальных связей, подвержены повышенному риску инсульта, тревожных расстройств, депрессии [1, 6]. Особенно уязвимы к воздействию социальной изоляции пациенты с хронической болью, сопровождающейся повышенной тревожностью и депрессией [6]. Социальная изоляция, являющаяся психоэмоциональным стрессором, приводит к обострению многих хронических заболеваний [3], а также вносит значимый вклад в развитие сердечно-сосудистых заболеваний [1, 7, 8]. Социально изолированные пожилые люди более подвержены развитию и рецидивам язвенной болезни желудка [2].

Для социально изолированных людей показан и повышенный риск смертности. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что риск смертности при социальной изоляции и одиночестве сопоставим или даже превосходит риски смертности, связанные с ожирением, курением, чрезмерным употреблением алкоголя, недостаточной физической активностью [1]. В то же время в литературе приводятся факты о том, что наличие социальных связей является защитным фактором и повышает шансы на выживание до 50% [1].

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19, оказавшая беспрецедентное воздействие на здоровье людей [8, 9], резко обострила проблему социальной изоляции. Ограничение социального взаимодействия во время пандемии COVID-19 привело к повышению тревожности и депрессии как у взрослых, так и у подростков [4, 5].

О признании значимости проблемы социальной изоляции на международном уровне свидетельствует тот факт, что в ноябре 2023 г. ВОЗ объявила об учреждении новой комиссии по социальным связям, которая начала заниматься проблемой изоляции и одиночества как серьезной угрозой здоровью человека. Признание этого факта стимулирует поиск мер, направленных на борьбу с негативным влиянием социальной изоляции, и эта ситуация является триггером для дальнейшего развития исследований данной проблемы на животных.

Одним из эффективных подходов для предотвращения и уменьшения негативных последствий изоляции является «обогащение» окружающей среды (Environmental Enrichment или Enriched Environment). Показано, что обогащенная среда может уменьшать тревожность и депрессию, улучшать обучение, память [10]. Факторы «обогащения» среды, такие как физическая активность, рисование, музыка, «виртуальная реальность» и многие другие, оказывают благотворное влияние на организм при различных заболеваниях [11, 12].

Для создания обогащенной среды в экспериментах на животных не существует единого протокола. Тем не менее наиболее распространенный «условный протокол», который используется нами в исследованиях на крысах, подразумевает содержание животных (как минимум 30 дней) в большой клетке с разнообразными предметами, которые часто заменяются и передвигаются, с обязательным социальным контактом с сородичами. При этом крысы помещаются в обогащенную среду часто (хотя и не всегда) сразу после отъема от матери. Комплекс мероприятий по созданию обогащенной среды направлен на обеспечение трех ключевых аспектов ее обогащения: новизны, социального контакта и повышенной физической активности [13].

Первые исследования с использованием «обогащенной среды» были выполнены давно. Согласно одному источнику [14] впервые обогащенную среду для содержа-

ния животных использовал Hebb в 1947 г. с целью изучения ее влияния на обучение и память. Другие авторы [13] приписывают начало современных исследований с обогащенной средой группе ученых – Diamond, Krech и Rosenzweig, которые в 1964 г. показали, что крысы, выращенные в обогащенных условиях, имеют более высокие когнитивные способности, чем крысы, выращенные в условиях социальной изоляции [15]. Эти работы послужили стимулом для дальнейших исследований с использованием обогащенной среды, результаты которых привели к заключению, что этот простой, недорогостоящий, немедикаментозный и нехирургический подход является чрезвычайно эффективным.

Показано, что содержание животных в обогащенной среде улучшает память, способность к обучению [10, 16, 17], увеличивает общительность [18], снижает стимулирующие и мотивационные эффекты наркотиков, алкоголя и вероятность рецидивов их приема [19, 20]. Обогащенная среда эффективно используется и для устранения негативных последствий социальной изоляции [21], в том числе таких, как депрессивно-поподобное поведение [22], повышенная тревожность [10].

После пандемии наблюдается новый всплеск интереса к изучению влияния условий содержания лабораторных животных на их состояние [5, 10, 23]. Однако при этом по-прежнему основной интерес в большинстве работ сосредоточен на обучении, памяти, поведении, и гораздо меньшее внимание уделяется изучению эффектов окружающей среды на висцеральную сферу. Существенным ограничением этих исследований является недостаточное внимание к тому, как условия окружающей среды влияют на общее функциональное состояние организма (состояние сердечно-сосудистой, дыхательной системы, желудочно-кишечного тракта, болевой чувствительности) и реакции на стрессорные воздействия.

В наших исследованиях мы стремимся заполнить пробел в этих знаниях, используя интегративный подход для изучения влияния условий содержания на общее состояние организма. Важно отметить, что как социальная изоляция, так и обогащенная среда являются стрессорами, воздействующими на весь организм. При этом мы исследуем влияние изоляции и обогащенной среды (как самой по себе, так и при реверсии условий содержания от изоляции к обогащенной среде и наоборот) на активность ключевой гормональной системы стресса – гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГТАКС), общее функциональное состояние организма крыс и развитие стресс-индуцированных заболеваний. Полученные нами ранее результаты свидетельствуют о возможности корректирующих эффектов негативных последствий социальной изоляции на функционирование организма с помощью обогащенной среды [24]. Настоящая работа является продолжением этих исследований.

Задача настоящей работы заключалась в изучении влияния условий содержания крыс – стандартных условий, социальной изоляции и обогащенной среды на стресс-реактивность ГТАКС, болевую чувствительность и поведение крыс после действия ультцерогенного стрессора.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Спрейг-Дуули из ЦКП «Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН» (Колтуши, Ленинградская обл.). Крысята 30-дневного возраста сразу после отъема от матери помещались на 30 дней в разные условия содержания: стандартные условия (СУ), социальную изоляцию (СИ) или обогащенную среду (ОС). В изоляции животные содержались по одной в стандартных непрозрачных пластиковых клетках для крыс (54 x 38 x 20 см), не имея физического и визуального контакта с другими крысами. В обогащенной среде крысы содержались по 6 особей в больших решетчатых клетках (100 x 50 x 80 см) с разными «обогащающими» аксессуарами: беговым колесом, домиками для укрытия, полками,

лестницами, трубами, гамаками, ванночками с водой и игрушками. Набор аксессуаров менялся три раза в неделю, за исключением бегового колеса, доступ к которому был открыт постоянно. Контролем для групп социальной изоляции и обогащенной среды являлись крысы, содержащиеся в стандартных непрозрачных пластиковых клетках по 6 штук (стандартные условия).

На протяжении 30-дневного периода еженедельно оценивали массу тела крыс во всех группах. Через 30 дней содержания в разных условиях – СУ, СИ или ОС – крысы были разделены на две группы, и эксперименты были продолжены согласно схеме (рис. 1).

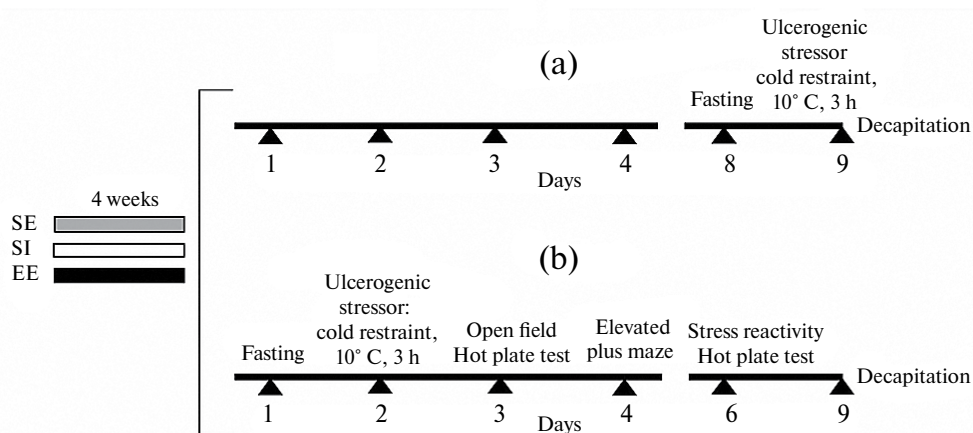


Рис. 1. Экспериментальная схема. Крысы 30-дневного возраста помещались на 4 недели в разные условия содержания: стандартные условия (СУ), социальную изоляцию (СИ) или обогащенную среду (ОС). Затем они были разделены на две группы, каждая из которых подвергалась действию ulcerогенного стрессора (УС): 3 ч иммобилизация при холоде (10 °С). В первой группе (а) исследовали влияние условий содержания только на чувствительность слизистой оболочки желудка к действию УС (эксперимент 1), во второй группе (б) изучали влияние условий содержания на поведение, стресс-реактивность ГТАКС и соматическую болевую чувствительность после действия УС (эксперимент 2).

В отдельном эксперименте, выполненном на отдельно подготовленных группах животных, было исследовано влияние условий содержания крыс – СУ, СИ, ОС – на стресс-реактивность ГТАКС в отсутствие действия УС. Схема этого эксперимента была аналогичной схеме эксперимента 1, однако при этом вместо предъявления ulcerогенного стимула тестировалась стресс-реактивность.

УС (3 ч иммобилизация при холоде, 10 °С) предъявляли крысам на фоне предварительного 24-часового голода, что уже через 3 ч действия УС приводило к образованию эрозий в слизистой оболочке желудка. В эксперименте 1 крыс декапитировали сразу после завершения действия УС. После декапитации извлекали желудок для оценки состояния его слизистой оболочки и собирали кровь из сосудов туловища для оценки уровня кортикостерона в крови. Площадь эрозий оценивали с помощью модифицированной компьютерной программы Image J [25].

В эксперименте 2 со следующего дня после действия УС (день 3) в течение недели на одних и тех же крысах последовательно тестировали поведение, соматическую болевую

чувствительность и стресс-реактивность ГТАКС, затем (день 8) крыс декапитировали и собирали кровь из сосудов туловища для оценки уровня кортикостерона в крови (рис. 1).

Поведение животных изучали с применением стандартных тестов «открытое поле» (тестирование реакции на стресс новизны, общей двигательной активности), «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) (анализ уровня тревожности). Исследование в тесте «открытое поле» проводили на следующий день после УС (день 3), в тесте ПКЛ – через день после УС (день 4).

Соматическую болевую чувствительность оценивали на основании латентного периода (ЛП) реакции облизывания лап в тесте «горячей пластины» (ООО «Алгоритм», Россия) при температуре 52 °С. Соматическую болевую чувствительность тестировали дважды: на 2-й (день 3) и 5-й день после действия УС (день 6). Между первым и вторым тестированием соматической болевой чувствительности осуществлялось тестирование поведения и стресс-реактивности ГТАКС. Интервал между тестированием соматической болевой чувствительности и предшествующим тестированием поведения или стресс-реактивности ГТАКС составлял не менее 3 ч. Тестирование ЛП болевой реакции проводилось в одно и то же время суток.

Стресс-реактивность ГТАКС оценивали на основании уровня кортикостерона в плазме крови в ответ на слабый процедурный стрессор (взятие крыс в руки, забор проб крови из кончика хвоста) через 30 и 60 мин после начала стрессорной процедуры. Уровень кортикостерона в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием набора реагентов «Кортикостерон крыса/мышь-ИФА» («ХЕМА») на анализаторе Star Fax 2100 (Awareness Technology Inc, США).

Результаты исследования были проанализированы с помощью программы MedCalc Version 12.2.1.0. (Статистика для биомедицинских исследований, MedCalc Software, Бельгия). Двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (Repeated measures ANOVA) был использован для анализа изменения массы тела, стресс-реактивности ГТАКС и соматической болевой чувствительности. Для оценки нормальности распределения использовали Kolmogorov-Smirnov test. Для оценки равенства дисперсий использовали Levene's test. В случае, когда гипотеза о равенстве дисперсий отвергалась, применяли непараметрический Kruskal-Wallis test. Однофакторный дисперсионный анализ (One way ANOVA) или Kruskal-Wallis тест был использован для сравнения площадей поражения слизистой оболочки желудка, уровней кортикостерона в плазме крови после декапитации крыс. Зависимость между уровнями кортикостерона в плазме крови и соматической болевой чувствительностью у крыс с активной и пассивной стратегией поведения оценивали на основании корреляции Пирсона (Pearson's correlations). Различия между группами в тестах «открытое поле» и ПКЛ оценивали с помощью теста Манна – Уитни. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM. Различия между группами считались значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние условий содержания крыс на массу тела

Условия содержания крыс влияли на изменение их массы тела. Содержание крыс в условиях СИ в течение 30 дней приводило к достоверно ($p < 0.05$) более быстрому увеличению их массы тела по сравнению с животными, содержащимися в ОС и СУ (рис. 2). Увеличение массы тела у крыс в условиях СИ по сравнению с массой тела крыс из ОС наблюдалось, начиная со второй недели содержания. Через три недели содержания масса тела у крыс в условиях СИ увеличивалась еще больше и превышала таковую уже не только у крыс из ОС, но и у животных, содержащихся в СУ (рис. 2). У крыс, содержащихся в ОС и СУ, достоверных отличий между массой тела обнаружено не было.

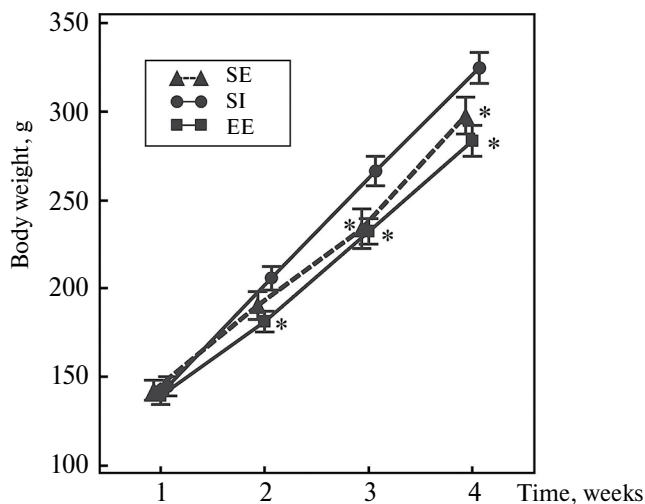


Рис. 2. Влияние условий содержания крыс на изменение массы тела в период, предшествующий экспериментам 1 и 2. Достоверность отличий при $p < 0.05$: * от группы «социальная изоляция» (СИ). ОС – обогащенная среда, СУ – стандартные условия. Количество случаев в группе $n = 11-12$.

Влияние условий содержания крыс на уровень кортикостерона в крови и образование эрозий в слизистой оболочке желудка через 3 ч после начала действия ulcerогенного стрессора

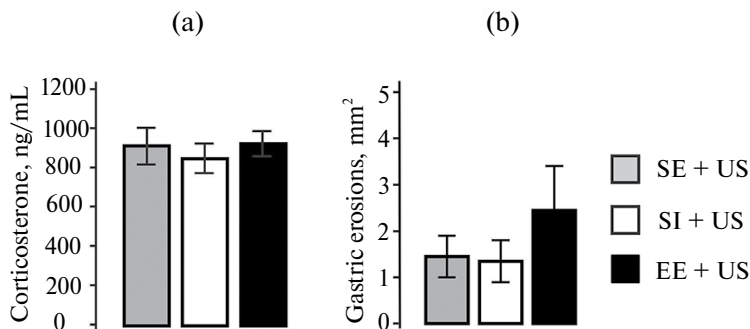


Рис. 3. Влияние условий содержания крыс на уровень кортикостерона в плазме крови после действия ulcerогенного стрессора (3 ч иммобилизация при холоде, 10 °C) (а) и среднюю площадь эрозий в желудке, индуцированных действием данного стрессора (б). ОС – обогащенная среда, СИ – изоляция, СУ – стандартные условия. Количество крыс: (а) – $n = 10-11$; (б) – $n = 12$.

После действия ulcerогенного стрессора (3 ч иммобилизация, 10 °C) не было обнаружено достоверных отличий между средними уровнями кортикостерона у крыс, содержащихся в СУ, ОС и СИ (рис. 3а). Трехчасовая иммобилизация при температуре 10 °C на фоне 24 ч голода приводила к появлению эрозивных повреждений в слизистой оболочке желудка крыс всех групп. Достоверных отличий ($p = 0.86$) в средней площади эрозивных повреждений желудка между группами также не было выявлено (рис. 3б).

Влияние условий содержания крыс на стресс-реактивность ГТАКС

Содержание крыс в условиях СИ не приводило к изменению стресс-реактивности ГТАКС в ответ на слабый процедурный стрессор (взятие крыс в руки, забор проб крови из кончика хвоста) по сравнению с таковой у контрольных крыс (СУ). В то же время содержание крыс в ОС вызывало повышение стресс-реактивности ГТАКС (рис. 4а).

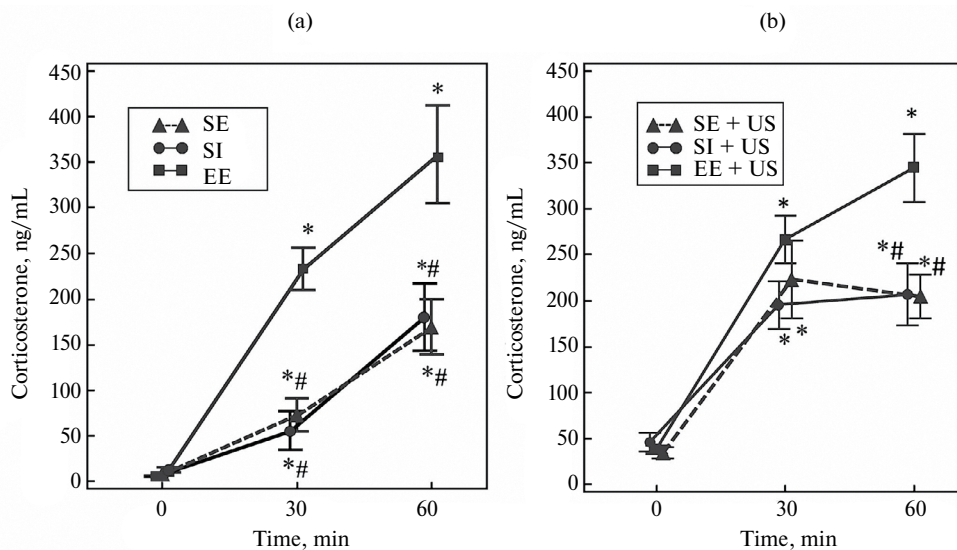


Рис. 4. Влияние условий содержания крыс на стресс-реактивность ГТАКС без ультразвукового стрессора (а) и в условиях его действия (3 ч иммобилизация, 10 °С) (б). Достоверность отличий при $p < 0.05$: * от базального уровня (0 точка); # от группы ОС (обогащенная среда). СИ – изоляция, СУ – стандартные условия. Количество случаев в группе $n = 6$.

Исходные (базальные) уровни кортикостерона в плазме (0 точка) достоверно не отличались ($p = 0.08$ (рис. 4а); $p = 0.73$ (рис. 4б)) между группами, содержащимися в ОС, СУ и СИ.

Слабый процедурный стресс приводил к повышению уровня кортикостерона в плазме крови (рис. 4). В отсутствие действия УС у всех групп животных через 30 мин наблюдалось увеличение уровня кортикостерона по сравнению с базальным уровнем, которое сохранялось и на 60-й минуте, при этом были обнаружены различия между группами как по величине уровня кортикостерона в ответ на процедурный стресс, так и по его динамике (рис. 4а). Крысы из ОС имели более высокий уровень кортикостерона в ответ на процедурный стресс на 30-й и 60-й минуте по сравнению с другими группами (рис. 4а), то есть они обладали большей стресс-реактивностью ГТАКС по сравнению с крысами из СУ и СИ. В группе ОС уровень кортикостерона сразу достигал своего максимума для данных условий и далее не изменялся (не было достоверных отличий между уровнями кортикостерона на 30-й и 60-й минуте), тогда как в группах СИ и СУ наблюдалось постепенное увеличение уровня кортикостерона, о чем свидетельствуют достоверные отличия ($p < 0.001$) между уровнями кортикостерона на 30-й и 60-й минуте.

Как и в отсутствие действия УС, после его применения у всех групп животных наблюдалось увеличение уровня кортикостерона на 30-й и 60-й минуте по сравнению с базальным уровнем, а также были обнаружены достоверные различия между группами (рис. 4б). Большая стресс-реактивность крыс из ОС по сравнению с другими груп-

пами сохранялась и в условиях действия УС. Об этом свидетельствует более высокий уровень кортикостерона у крыс из ОС по сравнению с крысами из СУ и СИ, однако данный эффект проявлялся только на 60-й минуте, тогда как на 30-й минуте достоверные отличия между группами отсутствовали ($p = 0.15$). Несмотря на то, что величина подъема уровня кортикостерона отличалась между группами, его динамика после действия УС была схожей во всех группах: уровень кортикостерона повышался на 30-й минуте и далее достоверно не изменялся (ни в одной из групп не было обнаружено достоверных отличий между точками 30 и 60 минут).

Группы СУ и СИ не отличались между собой ни по величине уровня кортикостерона в ответ на процедурный стресс, ни по его динамике, как в условиях действия УС, так и без него. При этом следует отметить, что в условиях предварительного ulcerогенного воздействия у этих групп (СУ и СИ) максимальный уровень кортикостерона в крови наблюдался раньше, уже на 30-й минуте, а не на 60-й, как это было в условиях без предварительного ulcerогенного воздействия.

*Влияние условий содержания крыс на реактивность к ulcerогенному стрессору:
поведенческие исследования*

Тест «Открытое поле»

При анализе поведения в тесте «Открытое поле» было обнаружено, что животные в группе СИ диаметрально различались по реакции на стресс, вырабатывая либо пассивную, либо активную поведенческую стратегию. В соответствии с этим экспериментальная группа СИ была разделена в поведенческих исследованиях на 2 подгруппы: активной (58% животных) и пассивной стратегии (42% животных), которые анализировались отдельно. Кроме того, эти подгруппы отдельно были проанализированы и в отношении болевой чувствительности.

Воздействие УС само по себе не оказало влияния на поведенческие показатели в «открытом поле» животных, содержавшихся в СУ (рис. 5). У крыс пассивной подгруппы СИ с последующим воздействием УС наблюдалось более чем трехкратное снижение двигательной активности, прежде всего горизонтальной (рис. 5). Их двигательная активность была значимо снижена по сравнению с таковой у животных других экспериментальных групп, в том числе содержавшихся в СУ или ОС (рис. 5). Достоверное, но менее выраженное снижение двигательной активности после действия УС наблюдалось также в группе крыс, содержавшихся в ОС (рис. 5).

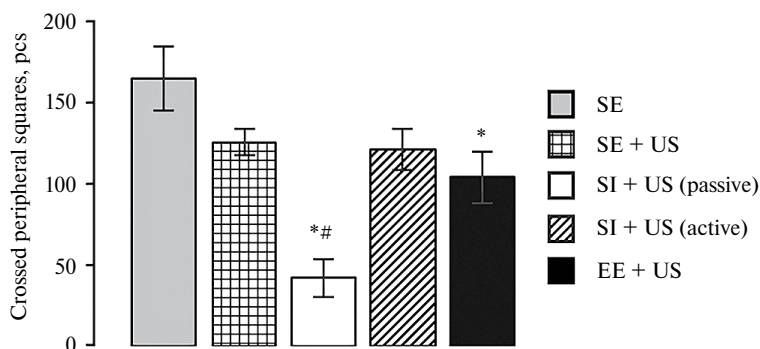


Рис. 5. Двигательная активность в «открытом поле»: количество пересеченных периферических квадратов. УС – ulcerогенный стрессор. Достоверность отличий при $p < 0.05$: * от СУ, # от всех остальных групп. СУ – стандартные условия, СИ – изоляция, ОС – обогащенная среда. Количество случаев в группах: $n = 6$ (СУ); $n = 18$ (СУ+УС); $n = 12$ (СИ+УС) и (ОС+УС).

Животные всех исследованных групп не имели достоверных отличий по времени груминга и количеству актов дефекации, которые могли бы свидетельствовать об эмоциональности, смещенной или стереотипной поведенческой активности.

Таким образом, по реакции на стрессор в группе СИ+УС животные приблизительно поровну разделяются на уязвимых (демонстрирующих депрессивноподобные реакции, пассивная подгруппа) и устойчивых (по реакции на СИ и УС не отличающихся от СУ, активная подгруппа). Подобная сниженная двигательная активность животных в тесте «открытого поля» может отражать выбор пассивных стрессорных копинг-стратегий или моторную заторможенность, характерную для постстрессорных депрессивноподобных состояний. УС в группе СУ не приводил к достоверным изменениям поведения. При этом содержание в ОС с последующим УС также незначительно, но достоверно снижало двигательную активность крыс относительно группы СУ, однако при этом животные данной группы значимо (более чем в 2 раза) отличались от пассивной подгруппы изоляции более высокой двигательной активностью.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В тесте ПКЛ сам по себе УС также не оказывал влияния на поведение животных, в частности, не обладал анксиогенным эффектом. Однако его сочетание с предварительной СИ значительно повышало уровень тревожности, что выражалось в достоверно меньшем количестве времени, проведенном в центре, а также выходов в центр и открытые рукава установки ПКЛ у всех крыс группы СИ+УС (рис. 6а, b, d). Время, проведенное в открытых рукавах ПКЛ, также имело тенденцию к снижению в группе СИ+УС, однако статистическая значимость по данному показателю не была достигнута вследствие большого разброса значений в контрольной группе (СУ) (рис. 6с). Не наблюдалось различий между группами СУ (контроль), СУ+УС, ОС+УС ни по одному из исследуемых показателей, характеризующих уровень тревожности. При этом время,

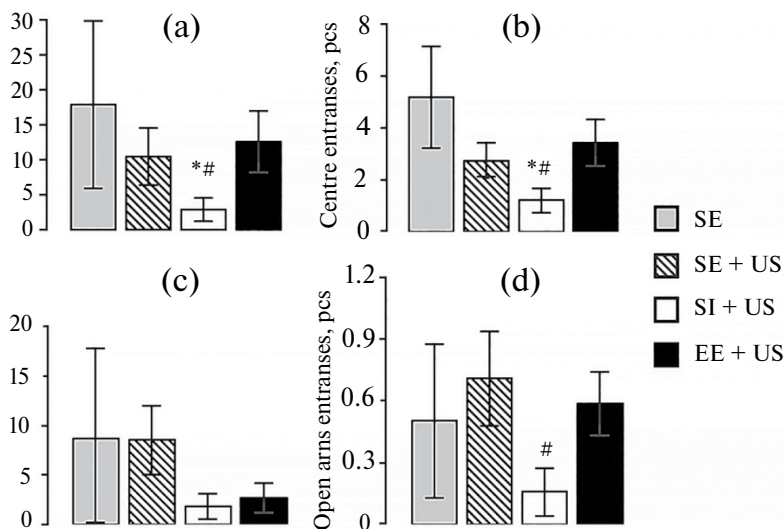


Рис. 6. Поведение животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». (а) – время в центре установки, (б) – количество выходов в центр, (с) – время в открытых рукавах, (д) – количество выходов в открытые рукава. УС – ультрогенный стрессор. Достоверность отличий при $p < 0.05$: * от СУ, # от ОС. СУ – стандартные условия, СИ – изоляция, ОС – обогащенная среда. Количество случаев в группах: $n = 6$ (СУ); $n = 18$ (СУ+УС); $n = 12$ (СИ+УС) и (ОС+УС).

проведенное в центре (рис. 6а), а также число выходов в центр и открытые рукава (рис. 6б, d) в группе ОС+УС были достоверно выше, чем в группе СИ+УС.

Важно отметить, что в отличие от «открытого поля» при тестировании в ПКЛ группа СИ не распадалась на две подгруппы с различающимися поведенческими реакциями. Это хорошо согласуется и с полученными данными по стресс-реактивности ГТАКС, при анализе которых было выявлено, что группы изолированных крыс с активной и пассивной стратегией поведения не отличаются между собой по стресс-реактивности ГТАКС. Не было обнаружено достоверных отличий между данными группами ни по уровню кортикостерона, ни по его динамике. Уровни кортикостерона на 60-й минуте у крыс, содержащихся в СИ, как с активной, так и пассивной стратегией поведения были достоверно меньше по сравнению с уровнем кортикостерона у крыс из ОС.

Таким образом, длительное нахождение крыс в СИ приводило к повышенному уровню тревожности в тесте ПКЛ. Повышенный уровень тревожности и сниженный уровень исследовательской активности в тесте ПКЛ может свидетельствовать об анксиогенном эффекте социальной изоляции у исследуемых крыс, причем данное тревожное состояние формировалось у большинства животных, в отличие от нарушений поведения у части изолированных животных, выявленных в тесте «открытого поля». Животные, содержащиеся в ОС, по уровню тревожности в ПКЛ не отличались от крыс группы СУ и СУ+УС.

Влияние условий содержания на соматическую болевую чувствительность крыс

Содержание крыс в различных условиях оказало влияние на соматическую болевую чувствительность в условиях действия УС. На следующий день после предъявления УС (день 3 на схеме, рис. 1) были обнаружены достоверные отличия между латентными периодами (ЛП) болевой реакции в ответ на действие термического стимула у крыс, содержащихся в различных группах (СУ, СИ и ОС). Крысы, содержащиеся в СИ, оказались наиболее чувствительны к действию термического болевого стимула: ЛП реакции облизывания лап в данной группе был достоверно меньше ($p < 0.05$) по сравнению с таковым в группах СУ и ОС. В то же время крысы, содержащиеся в ОС, имели наименьшую чувствительность к действию термического болевого стимула по сравнению с чувствительностью к данному стимулу крыс из СУ и СИ. ЛП данной группы во всех случаях существенно превышали ($p < 0.05$) ЛП, измеренные у других групп крыс (рис. 7). В свою очередь, ЛП крыс из СУ достоверно ($p < 0.05$) превышали ЛП у крыс, находящихся в условиях СИ, но были меньше, чем ЛП болевой реакции у крыс из ОС. При втором

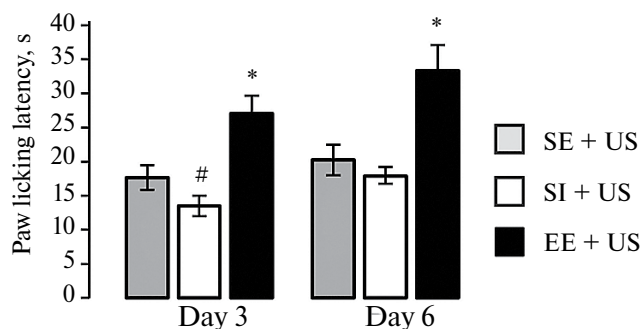


Рис. 7. Влияние условий содержания крыс на соматическую болевую чувствительность крыс в тесте «горячей пластины» на следующий день (день 3) и на 5-й день (день 6) после действия ulcerогенного стрессора (3 ч иммобилизация, 10 °С). Достоверность отличий при $p < 0.05$: * от групп СИ+УС и СУ+УС; # от группы СУ (стандартные условия). ОС – обогатщенная среда, СИ – социальная изоляция, УС – ulcerогенный стрессор. Количество случаев в группе $n = 10-12$.

тестировании ЛП болевой реакции, так же как и при первом тестировании, крысы из ОС были наименее чувствительны к действию болевого раздражителя: не было обнаружено отличий между ЛП у крыс, содержавшихся в условиях СИ и СУ на 5-й день после действия УС (день 6 на схеме, рис. 1), но при этом ЛП болевой реакции у крыс из ОС оставался стабильным и достоверно ($p < 0.05$) превышал ЛП у крыс из групп СУ и СИ.

Поскольку в тесте «открытое поле» было продемонстрировано разделение крыс, содержавшихся в СИ, на две подгруппы – с активной и пассивной стратегией поведения, в данных подгруппах мы оценивали также и соматическую болевую чувствительность. Сравнение средних ЛП реакции облизывания лап у крыс, находящихся в условиях СИ с пассивной (16.3 ± 1.9 с, $n = 5$) и активной (12.7 ± 2.1 с, $n = 7$) стратегией поведения, не выявило достоверных отличий между данными группами. Однако средние ЛП как «пассивных», так и «активных» крыс были достоверно ($p < 0.05$) меньше по сравнению с ЛП в группе крыс из ОС, причем у «активных» крыс они были достоверно ($p < 0.05$)

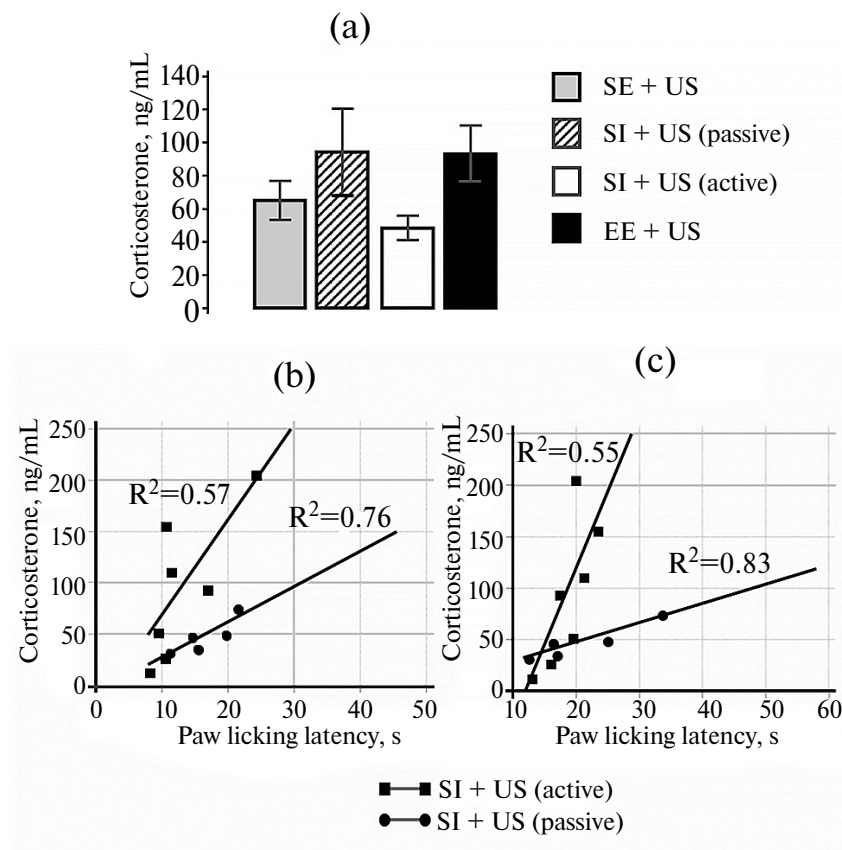


Рис. 8. Средние уровни кортикостерона в плазме у крыс с активной и пассивной стратегией поведения, содержащихся в социальной изоляции (СИ), и крыс, содержащихся в обогащенной среде (ОС) и стандартных условиях (СУ) после действия ультракороткого стрессора (УС) (а), а также зависимость между уровнем кортикостерона в плазме крови и соматической болевой чувствительностью у крыс с активной и пассивной стратегией поведения после первого (б) и второго (в) тестирования соматической болевой чувствительности. Достоверность отличий при $p < 0.05$: * от группы ОС+УС. Количество случаев в группах: $n = 5$ (СИ (пассивная)); $n = 7$ (СИ (активная)); $n = 11$ (СУ); $n = 12$ (ОС).

меньше не только по сравнению с группой ОС (27.0 ± 2.7 с, $n = 12$), но и по сравнению с группой СУ (22.0 ± 2.8 с, $n = 11$). При этом было показано, что уровень кортикостерона у «пассивных» крыс, содержащихся в группе СИ, достоверно ($p < 0.05$) ниже по сравнению с уровнями кортикостерона у крыс, содержащихся в ОС (рис. 8а).

Была обнаружена корреляционная зависимость между уровнем кортикостерона и ЛП реакции облизывания лап, измеренными у одних и тех же крыс как с пассивной, так и активной стратегией поведения, находящихся в условиях СИ. Коэффициенты корреляции для «активных» и «пассивных» крыс в группе СИ при первом тестировании соматической болевой чувствительности после действия УС (день 3) составляли 0.75 ($p = 0.058$) и 0.87 ($p < 0.05$) соответственно; а при втором тестировании (день 6) – 0.74 ($p < 0.05$) и 0.94 ($p < 0.02$) соответственно. Таким образом, меньшему ЛП и, следовательно, большей чувствительности к термическому болевому стимулу соответствовал более низкий уровень кортикостерона в крови (рис. 8б и с).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного сравнительного исследования свидетельствуют о том, что условия содержания крыс в течение 1 месяца после отъема от матери – СИ, ОС и СУ – влияют на функциональное состояние организма, их стрессоустойчивость и поведение. СИ крыс приводила к более быстрому увеличению массы их тела с увеличением возраста, повышению уровня тревожности, появлению депрессивноподобных реакций у половины исследованных животных, увеличению чувствительности к болевому воздействию. В то же время крысы, содержащиеся в ОС, отличались повышенной стресс-реактивностью ГТАКС, большей моторной и исследовательской активностью, меньшей тревожностью и меньшей чувствительностью к болевому воздействию. Полученные данные свидетельствуют о том, что СИ крыс оказывает негативное влияние на общее функциональное состояние их организма, ОС, напротив, приводит к позитивным изменениям в организме.

В нашей работе изменения условий содержания крыс начались с первого месяца после отъема от матери, поскольку известно, что СИ в раннем возрасте приводит к негативным последствиям для организма. Нарушение социального взаимодействия в ранние критические периоды развития негативно влияет на когнитивные, социальные и речевые способности и в дальнейшем может повышать предрасположенность к развитию тревожных или депрессивных расстройств [4], увеличивать риск употребления наркотиков и алкоголя [20].

Выявленное влияние СИ на повышение массы тела у крыс с увеличением их возраста хорошо согласуется с данными литературы [26–28]. Одной из причин такого последствия СИ может являться увеличенное потребление пищи вследствие нарушения пищевого поведения [26, 27].

Влияние СИ и ОС на активность ГТАКС, болевую чувствительность и поведение крыс исследовали после действия УС (3 ч иммобилизации при холоде), которому подвергались крысы через 4 недели после их содержания в разных условиях. Включение УС в схему основного эксперимента (рис. 1б), а также в отдельный самостоятельный эксперимент (рис. 1а) было сделано по двум причинам.

Первая причина определяется нашим интересом к проблеме язвообразования в желудке, изучением которой мы занимаемся [29–32], фокусируясь на выявленной нами роли глюкокортикоидных гормонов в гастропротекции [33, 34]. Один из важных аспектов этих исследований связан с выяснением целостной картины состояния организма при язвообразовании в желудке, отражающей как влияние общего состояния организма на процесс язвообразования [35–37], так и влияние язвенной патологии на общее состояние организма [38]. Согласно результатам настоящей работы, СИ или ОС не оказали значимого влияния ни на образование эрозий в слизистой оболочке желудка, ни на уровень кортикостерона в крови через 3 ч после начала действия УС. Слишком сильное

стрессорное воздействие (иммобилизация при холоде) могло нивелировать эффекты предшествующих условий содержания животных. Это предположение поддерживают данные об усугубляющем влиянии СИ на язвообразование в желудке, индуцированное более мягкими ulcerогенными стимулами, например, такими как иммобилизация без холода [39] или 2-часовое действие индометацина [24]. Отсутствие влияния условий содержания на стресс-индуцированный гормональный ответ хорошо согласуется с отсутствием их влияния и на стресс-индуцированные эрозии. Согласно результатам наших работ, направленных на оценку гастропротективной роли глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при стрессе, усугубление образования эрозий, индуцированных 3-часовой иммобилизацией при холоде, наблюдается при существенном снижении стресс-индуцированной продукции кортикостерона у крыс [33]. Условия содержания крыс – ОС и СИ – являются умеренными воздействиями, после которых, вероятно, стоит ожидать изменений в стресс-реактивности ГГАС лишь на более слабые стрессоры, что мы и показали в настоящей работе с использованием слабого процедурного стрессора.

Другая причина проведения исследований с включением в эксперимент УС связана с недостатком работ о влиянии СИ и ОС на стрессоустойчивость и поведение с использованием физических стрессоров. При исследовании влияния условий содержания на поведение и стрессоустойчивость обычно изучают реакцию крыс на психоэмоциональный, социальный стрессор (тесты на социальное взаимодействие или поражение) [13], мало работ, в которых используется физический (иммобилизация, холод) стрессор [40].

Важным показателем функционального состояния любой гормональной системы является ее реактивность на воздействия, при этом оцениваются: фазность реакции, ее амплитуда, скорость выключения. С целью анализа реактивности ГГАС на более слабое стрессорное воздействие исследовали выброс кортикостерона в ответ на слабый процедурный стрессор. Было установлено, что содержание животных в ОС с последующим УС, а также и без него приводит к умеренному повышению стресс-реактивности ГГАС. Аналогичный профиль динамики активации ГГАС был ранее описан нами для гипоксического прекондиционирования – немедикаментозного воздействия, значительно повышающего устойчивость к неблагоприятным факторам, в том числе стрессорам [41]. Модификация стресс-реактивности ГГАС, очевидно, представляет собой один из важных механизмов, обеспечивающих повышение стрессоустойчивости у животных, содержащихся в ОС. О том, что выявленное повышение стресс-реактивности ГГАС может способствовать повышению адаптационного потенциала организма, свидетельствуют результаты нашей предыдущей работы, демонстрирующие увеличение работоспособности у животных, содержащихся 1 месяц в точно таких же условиях ОС [24]. Полученные нами данные хорошо согласуются с представлением о том, что ОС – это «прививочный» стрессор, повышающий устойчивость организма к последующим стрессорным воздействиям [13]. Мы рассматриваем ОС как умеренный прекондиционирующий стрессор с большим адаптационным потенциалом. Полученные в настоящей работе данные хорошо согласуются с результатами наших предыдущих исследований, демонстрирующих адаптивные эффекты стрессорного прекондиционирования [42].

Условия содержания – СИ и ОС – по-разному влияли на ориентировочно-исследовательское поведение крыс. Нами было установлено, что в тесте «открытое поле» животные из группы СИ приблизительно поровну разделялись на уязвимых (демонстрирующих депрессивноподобные реакции) и устойчивых (по реакции на УС не отличающихся от контрольных). При этом все крысы после СИ демонстрировали повышенный уровень тревожности и сниженный уровень исследовательской активности в тесте ПКЛ. Крысы, содержащиеся в ОС, отличались от крыс, содержащихся в СИ, большей моторной и исследовательской активностью, а также меньшей тревожностью. Таким образом, СИ в раннем возрасте у крыс в нашем исследовании привела к развитию повышенной тревожности и реакциям избегания при помещении в новую обстановку, что согласуется с данными литературы [43, 44].

В литературе имеются и данные о развитии депрессивноподобных проявлений у крыс при СИ [45], которые оцениваются по изменению локомоторной активности в тесте «открытое поле», что тоже согласуется с нашими результатами. Однако нами впервые было выявлено, что популяция крыс после СИ не является однородной по развитию депрессивноподобных реакций, а подразделяется на две подгруппы – активную и пассивную. Полученные данные могут иметь прикладное значение. Изучение индивидуальных причин уязвимости к социальной изоляции может быть важным для профилактики таких состояний у некоторых групп людей.

Обогащение среды не оказывало влияния на уровень тревожности у крыс как в нашем эксперименте, так и в исследованиях других авторов [43, 44]. Такие крысы проводили достаточно много времени в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта или открытом поле, исследуя окружающую среду, что является полной противоположностью поведения крыс из СИ.

Данные литературы свидетельствуют о высокой степени коморбидности между депрессией и болью: боль является фактором риска для развития депрессии, а депрессия, в свою очередь, может усугублять хроническую боль [46, 47]. В связи с этим в наших экспериментах мы исследовали влияние условий содержания крыс и ulcerогенного стрессора не только на тревожность и депрессивноподобное поведение крыс, но и на их соматическую болевую чувствительность.

Полученные данные о влиянии ОС на соматическую болевую чувствительность находятся в соответствии с результатами наших предыдущих исследований и значительно расширяют их. Ранее мы показали, что содержание крыс в течение длительного времени (6 недель) как в условиях СИ, так и в условиях ОС само по себе вызывает уменьшение соматической болевой чувствительности, при этом крысы из ОС продемонстрировали наименьшую чувствительность к действию болевого раздражителя по сравнению с другими группами [24]. Согласно результатам настоящей работы, наименьшая чувствительность к действию болевого стимула у крыс из ОС сохраняется и после УС, что хорошо согласуется с данными литературы о том, что длительное содержание крыс в ОС может уменьшать хроническую боль, вызванную повреждением периферического нерва [48, 49], воспалением [10] или мигренью [50].

Несмотря на то, что СИ сама по себе, как и ОС, может вызывать снижение соматической болевой чувствительности [24, 51], в условиях дополнительного действия УС крысы, содержавшиеся в СИ, продемонстрировали усиление болевой чувствительности по сравнению с другими группами (рис. 7). Полученные данные, как и результаты других исследователей об усугублении хронической боли в условиях СИ [52], – стимул для поиска возможных способов коррекции негативных последствий СИ на болевую чувствительность. Результаты настоящей работы вместе с ранее полученными нами данными [24] свидетельствуют в пользу того, что «обогащение» среды может быть одним из возможных нефармакологических подходов к уменьшению боли в условиях патологии.

Новым фактом, который мы обнаружили в настоящей работе, является позитивная корреляция между уровнем кортикостерона в плазме крови и ЛП болевой реакции у крыс в группе СИ, что свидетельствует о возможности участия глюкокортикоидных гормонов в регуляции болевой чувствительности в данных условиях. На основании результатов настоящей работы, а также наших предыдущих исследований [31, 53] можно предположить, что одной из причин усиления болевой чувствительности крыс в СИ является снижение функциональной активности ГТАКС, особенно ярко выраженное у крыс с пассивной стратегией поведения (рис. 8а). Следует отметить, что крысы с пассивной стратегией поведения, имеющие низкие болевые пороги и низкий уровень кортикостерона (рис. 8б, с), продемонстрировали также и депрессивноподобное поведение, что находится в соответствии с данными литературы о коморбидности между депрессией и болью [47].

Полученные данные – новые знания, значимо дополняющие результаты последних исследований, фокусирующихся на разработке нефармакологических подходов для уменьше-

ния боли, связанных с активацией естественных для организма защитных противоболевых механизмов [49, 54, 55], в том числе и вовлекающих глюкокортикоидные гормоны [56].

Оригинальность проведенного исследования и полученных результатов заключается в комплексном сравнительном подходе к решению вопроса о влиянии как СИ, так и ОС на функциональное состояние всего организма. Полученные результаты – новые аргументы в пользу ранее сделанного заключения [24] о том, что СИ крыс оказывает дезадаптивное влияние на их общее функциональное состояние, а ОС, напротив, приводит к адаптивным изменениям в организме. В целом результаты настоящей работы вносят вклад в существующие знания о негативном влиянии СИ и позитивном влиянии ОС на функционирование организма.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории экспериментальной эндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН Т.И. Колбасовой и Л.А. Афанасьевой за помощь в проведении экспериментов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л. П. Ф., Е. А. Р., Н. И. Я.), проведение эксперимента (Н. И. Я., М. Ю. З., О. Ю. М., С. Е. Ж., К. А. Б., О. П. К.), обработка данных (Н. И. Я., М. Ю. З., О. П. К.), написание и редактирование рукописи (Л. П. Ф., Е. А. Р., Н. И. Я.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета гранта НЦМУ Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости» Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 075–15–2022–303 от 21.04.2022 г.). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по содержанию и использованию животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 12/07 от 07.12.2020 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Holt-Lunstad J* (2021) A pandemic of social isolation? *World Psychiatry* 20: 55–56.
<https://doi.org/10.1002/WPS.20839>
2. *Fang B, Yang S, Liu H, Zhang Y, Xu R, Chen G* (2019) Association between depression and subsequent peptic ulcer occurrence among older people living alone: A prospective study investigating the role of change in social engagement. *J Psychosom Res* 122: 94–103.
<https://doi.org/10.1016/J.JPSYCHORES.2019.04.002>
3. *Mikocka-Walus A, Skvarc D, de Acosta MB, Evertsz FB, Bernstein CN, Burisch J, Ferreira N, Gearry RB, Graff LA, Jedel S, Mokrowiecka A, Stengel A, Trindade IA, van Tilburg MAL, Knowles SR* (2022) Exploring the Relationship Between Self-Isolation and Distress Among People with Gastrointestinal Disorders During the COVID-19 Pandemic. *J Clin Psychol Med Settings* 29: 654–665.
<https://doi.org/10.1007/S10880-021-09818-9>

4. *Xiong Y, Hong H, Liu C, Zhang YQ* (2023) Social isolation and the brain: effects and mechanisms. *Mol Psychiatry* 28: 191–201.
<https://doi.org/10.1038/S41380-022-01835-W>
5. *Zhang P, Yan J, Wei J, Li Y, Sun C* (2024) Disrupted synaptic homeostasis and partial occlusion of associative long-term potentiation in the human cortex during social isolation. *J Affect Disord* 344: 207–218.
<https://doi.org/10.1016/J.JAD.2023.10.080>
6. *Bannon S, Greenberg J, Mace RA, Locascio JJ, Vranceanu AM* (2021) The role of social isolation in physical and emotional outcomes among patients with chronic pain. *Gen Hosp Psychiatry* 69: 50–54.
<https://doi.org/10.1016/J.GENHOSPPSYCH.2021.01.009>
7. *Лобов ГИ* (2024) Социальная изоляция: связь с заболеваниями сердечно-сосудистой системы. *Успехи физиол наук* 55(1): 31–46. [*Lobov GI* (2024) Social isolation relationship with cardiovascular diseases. *Uspekhi fiziol nauk* 55(1): 31–46. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179824010045>
8. *Golaszewski NM, Lacroix AZ, Godino JG, Allison MA, Manson JE, King JJ, Weitlauf JC, Bea JW, Garcia L, Kroenke CH, Saquib N, Cannell B, Nguyen S, Bellettiere J* (2022) Evaluation of Social Isolation, Loneliness, and Cardiovascular Disease Among Older Women in the US. *JAMA Netw open* 5: e2146461.
<https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2021.46461>
9. *Bu F, Steptoe A, Fancourt D* (2020) Who is lonely in lockdown? Cross-cohort analyses of predictors of loneliness before and during the COVID-19 pandemic. *Public Health* 186: 31–34.
<https://doi.org/10.1016/J.PUHE.2020.06.036>
10. *Guven EB, Pranic NM, Unal G* (2022) The differential effects of brief environmental enrichment following social isolation in rats. *Cogn Affect Behav Neurosci* 22: 818–832.
<https://doi.org/10.3758/S13415-022-00989-Y>
11. *Leemhuis E, Esposito RM, De Gennaro L, Pazzaglia M* (2021) Go Virtual to Get Real: Virtual Reality as a Resource for Spinal Cord Treatment. *Int J Environ Res Public Health* 18: 1–10.
<https://doi.org/10.3390/IJERPH18041819>
12. *Sihvonen AJ, Pitkaniemi A, Särkämö T, Soinila S* (2022) Isn't There Room for Music in Chronic Pain Management? *J Pain* 23: 1143–1150.
<https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2022.01.003>
13. *Crofton EJ, Zhang Y, Green TA* (2015) Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. *Neurosci Biobehav Rev* 49: 19–31.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2014.11.017>
14. *Brown RE* (2020) Donald O. Hebb and the organization of behavior: 17 years in the writing. *Mol Brain* 13.
<https://doi.org/10.1186/S13041-020-00567-8>
15. *Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR* (1964) The effects of an enriched environment of histology of rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 123: 111–119.
<https://doi.org/10.1002/CNE.901230110>
16. *Wang H, Xu X, Xu X, Gao J, Zhang T* (2020) Enriched Environment and Social Isolation Affect Cognition Ability via Altering Excitatory and Inhibitory Synaptic Density in Mice Hippocampus. *Neurochem Res* 45: 2417–2432.
<https://doi.org/10.1007/S11064-020-03102-2>
17. *Braun MD, Kisko TM, Witt SH, Rietschel M, Schwarting RKW, Wöhr M* (2019) Long-term environmental impact on object recognition, spatial memory and reversal learning capabilities in Cacna1c-haploinsufficient rats. *Hum Mol Genet* 28: 4113–4131.
<https://doi.org/10.1093/HMG/DDZ235>
18. *Popa N, Boyer F, Jaouen F, Belzeaux R, Gascon E* (2020) Social Isolation and Enrichment Induce Unique miRNA Signatures in the Prefrontal Cortex and Behavioral Changes in Mice. *Science* 23(12): 101790.
<https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.101790>
19. *Lopez MF, Laber K* (2015) Impact of social isolation and enriched environment during adolescence on voluntary ethanol intake and anxiety in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 148: 151–156.
<https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2014.11.012>
20. *Vannan A, Powell GL, Scott SN, Pagni BA, Neisewander JL* (2018) Animal Models of the Impact of Social Stress on Cocaine Use Disorders. *Int Rev Neurobiol* 140: 131–169.
<https://doi.org/10.1016/BS.IRN.2018.07.005>
21. *Zhao X, Mohammed R, Tran H, Erickson M, Kentner AC* (2021) Poly (I: C)-induced maternal immune activation modifies ventral hippocampal regulation of stress reactivity: prevention by environmental enrichment. *Brain Behav Immun* 95: 203–215.
<https://doi.org/10.1016/J.BBI.2021.03.018>

22. *Guarnieri LO, Pereira-Caixeta AR, Medeiros DC, Aquino NSS, Szawka RE, Mendes E M A M, Moraes MFD, Pereira GS* (2020) Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. *Transl Psychiatry* 10(1): 33.
<https://doi.org/10.1038/S41398-020-0701-5>
23. *Крупина НА, Ширенова СД* (2023) Нарушения когнитивных функций при длительной социальной изоляции: результаты исследований на людях и экспериментов на животных. *Успехи физиол наук* 54(3): 18–35. [*Krupina NA, Shirenova SD* (2023) Cognitive impairment under prolonged social isolation: insights from human studies and animal experiments. *Uspekhi fiziol nauk* 54(3): 18–35. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179823040045>
24. *Filaretova LP, Komkova OP, Morozova OY, Punina PV, Yarushkina NI* (2024) Environmental enrichment reverses pro-ulcerogenic action of social isolation on the gastric mucosa and positively influences pain sensitivity and work capacity. *Inflammopharmacology* 32: 909–915.
<https://doi.org/10.1007/S10787-024-01451-W>
25. *Солнушкин СД, Чихман ВН* (2018) Компьютерная обработка биологических изображений. *Биомед радиоэлектрон* 2: 35–40. [*Solnushkin SD, Chikhman VN* (2018) Experience of biological image processing. *Biomed Radioelectron* 2: 35–40. (In Russ)].
26. *Jahng JW, Yoo SB, Ryu V, Lee JH* (2012) Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. *Int J Dev Neurosci* 30: 47–53.
<https://doi.org/10.1016/J.IJDEVNEU.2011.10.001>
27. *Dulabi AN, Shakerin Z, Mehranfard N, Ghasemi M* (2020) Vitamin C protects against chronic social isolation stress-induced weight gain and depressive-like behavior in adult male rats. *Endocr Regul* 54: 266–274.
<https://doi.org/10.2478/ENR-2020-0030>
28. *Belardo C, Alessio N, Pagano M, De Dominicis E, Infantino R, Perrone M, Iannotta M, Galderisi U, Rinaldi B, Scuteri D, Bagetta G, Palazzo E, Maione S, Luongo L* (2022) PEA-OXA ameliorates allodynia, neuropsychiatric and adipose tissue remodeling induced by social isolation. *Neuropharmacology* 208: 108978.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2022.108978>
29. *Filaretova LP, Morozova OY, Yarushkina NI* (2021) Peripheral corticotropin-releasing hormone may protect the gastric mucosa against indometacin-induced injury through involvement of glucocorticoids. *J Physiol Pharmacol* 72: 1–10.
<https://doi.org/10.26402/JPP.2021.5.06>
30. *Filaretova L, Komkova O, Sudalina M, Yarushkina N* (2021) Non-Invasive Remote Ischemic Preconditioning May Protect the Gastric Mucosa Against Ischemia-Reperfusion-Induced Injury Through Involvement of Glucocorticoids. *Front Pharmacol* 12: 682643.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.682643>
31. *Filaretova L, Podvigina T, Yarushkina N* (2020) Physiological and pharmacological effects of glucocorticoids on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 26(25): 2962–2970.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200521142746>
32. *Yarushkina NI, Komkova OP, Filaretova LP* (2020) Influence of forced treadmill and voluntary wheel running on the sensitivity of gastric mucosa to ulcerogenic stimuli in male rats. *J Physiol Pharmacol* 71: 1–13.
<https://doi.org/10.26402/JPP.2020.6.04>
33. *Filaretova LP, Filaretov AA, Makara GB* (1998) Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats. *Am J Physiol* 274: G1024-G1030.
34. *Filaretova L, Bagaeva T, Makara GB* (2002) Aggravation of nonsteroidal antiinflammatory drug gastropathy by glucocorticoid deficiency or blockade of glucocorticoid receptors in rats. *Life Sci* 71: 2457–2468.
35. *Filaretova L* (2006) The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Hormonal brain-gut interaction and gastroprotection. *Auton Neurosci* 125: 86–93.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.01.005>
36. *Подвигина ТТ, Комкова ОП, Ветровой ОВ, Ярушкина НИ, Филаретова ЛП* (2023) Сравнение влияния содержания крыс в горах и на равнине на развитие стрептозотоцин-индуцированного диабета и язвообразование в желудке. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109(10): 1457–1475. [*Podvigina TT, Komkova OP, Vetrovoy OV, Yarushkina NI, Filaretova LP* (2023) Comparison of the Effect of Keeping Rats in the Mountains and on the Plain on the Development of Streptozotocin-Induced Diabetes and Gastric Ulceration. *Rus Physiol J* 109(10): 1457–1475. (In Russ)].

37. Yarushkina NI, Podvigina TT, Komkova OP, Morozova OYu, Punina PV, Filaretova LP (2023) Comparative Analysis of the Effects of Insulin and Metformin on the Ulcerogenic Action of Indomethacin in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Evol Biochem Physiol* 59(6): 2399–2412.
<https://doi.org/10.1134/s0022093023060406>
38. Filaretova LP, Bagaeva TR, Morozova OY, Zelena D (2014) A wider view on gastric erosion: detailed evaluation of complex somatic and behavioral changes in rats treated with indomethacin at gastric ulcerogenic dose. *Endocr Regul* 48: 163–172.
https://doi.org/10.4149/ENDO_2014_04_163
39. Gamallo A, Villanua A, Trancho G, Fraile A (1986) Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol Behav* 36: 217–221.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90006-5)
40. Hofford RS, Prendergast MA, Bardo MT (2018) Modified single prolonged stress reduces cocaine self-administration during acquisition regardless of rearing environment. *Behav Brain Res* 338: 143–152.
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.10.023>
41. Рыбникова ЕА, Миронова ВИ, Пивина СГ, Ордян НЭ, Тюлькова ЕИ, Самойлов МО (2008) Гормональные механизмы нейропротективных эффектов гипоксического preconditionирования у крыс. Докл РАН 421(5): 713–715. [Rybnikova EA, Mironova VI, Pivina SG, Ordyan NE, Tulkova EI, Samoilov MO (2008) Hormonal mechanisms of neuroprotective effects of the mild hypoxic preconditioning in rats. *Dokl Biol Sci* 421(5): 239–240. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0012496608040054>
42. Filaretova L (2017) Gastroprotective Effect of Stress Preconditioning: Involvement of Glucocorticoids. *Curr Pharm Des* 23: 3923–3927.
<https://doi.org/10.2174/1381612823666170215145125>
43. Grigoryan GA, Pavlova IV, Zaichenko MI (2022) Effects of Social Isolation on the Development of Anxiety and Depression-Like Behavior in Model Experiments in Animals. *Neurosci Behav Physiol* 52: 722–738.
<https://doi.org/10.1007/S11055-022-01297-1>
44. Pritchard LM, Van Kempen TA, Zimmerberg B (2013) Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. *Neurosci Lett* 536: 47–51.
<https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2012.12.048>
45. Brenes JC, Fornaguera J, Sequeira-Cordero A (2020) Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. *Front Pharmacol* 11: 804.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00804>
46. Silveira J, Oliveira D, Martins A, Costa L, Neto F, Ferreira-Gomes J, Vaz C (2024) The association between anxiety and depression symptoms and clinical and pain characteristics in patients with hip and knee osteoarthritis. *ARP Rheumatol*.
47. Bravo L, Llorca-Torralba M, Suárez-Pereira I, Berrocoso E (2020) Pain in neuropsychiatry: Insights from animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 115: 96–115.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2020.04.029>
48. Falkowska M, Ntamati NR, Nevian NE, Nevian T, Acuña MA (2023) Environmental enrichment promotes resilience to neuropathic pain-induced depression and correlates with decreased excitability of the anterior cingulate cortex. *Front Behav Neurosci* 17: 1139205.
<https://doi.org/10.3389/FNBEH.2023.1139205>
49. Wang X ming, Zhang G fen, Jia M, Xie Z min, Yang J jun, Shen J chun, Zhou Z qiang (2019) Environmental enrichment improves pain sensitivity, depression-like phenotype, and memory deficit in mice with neuropathic pain: role of NPAS4. *Psychopharmacology (Berl)* 236: 1999–2014.
<https://doi.org/10.1007/S00213-019-5187-6>
50. Wang L, Liu X, Zhu C, Wu S, Li Z, Jing L, Zhang Z, Jing Y, Wang Y (2024) Environmental enrichment alleviates hyperalgesia by modulating central sensitization in a nitroglycerin-induced chronic migraine model of mice. *J Headache Pain* 25(1): 74.
<https://doi.org/10.1186/S10194-024-01779-2>
51. Horiguchi N, Ago Y, Hasebe S, Higashino K, Asada K, Kita Y, Takuma K, Matsuda T (2013) Isolation rearing reduces mechanical allodynia in a mouse model of chronic inflammatory pain. *Pharmacol Biochem Behav* 113: 46–52.
<https://doi.org/10.1016/J.PBB.2013.10.017>
52. Bravo L, Alba-Delgado C, Torres-Sanchez S, Mico JA, Neto FL, Berrocoso E (2013) Social stress exacerbates the aversion to painful experiences in rats exposed to chronic pain: the role of the locus coeruleus. *Pain* 154: 2014–2023.
<https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2013.06.021>

53. *Filaretov AA, Bogdanov AI, Yarushkina NI* (1996) Stress-induced analgesia. The role of hormones produced by the hypophyseal-adrenocortical system. *Neurosci Behav Physiol* 26(6): 572–578.
<https://doi.org/10.1007/BF02359502>
54. *Metcalf CS, Huntsman M, Garcia G, Kochanski AK, Chikinda M, Watanabe E, Underwood T, Vanegas F, Smith MD, White HS, Bulaj G* (2019) Music-Enhanced Analgesia and Antiseizure Activities in Animal Models of Pain and Epilepsy: Toward Preclinical Studies Supporting Development of Digital Therapeutics and Their Combinations With Pharmaceutical Drugs. *Front Neurol* 10: 1–16.
<https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00277>
55. *Kimura LF, Mattaraia VG de M, Pico G* (2019) Distinct environmental enrichment protocols reduce anxiety but differentially modulate pain sensitivity in rats. *Behav Brain Res* 364: 442–446.
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.11.012>
56. *Orock A, Johnson AC, Mohammadi E, Greenwood-Van Meerveld B* (2023) Environmental enrichment reverses stress-induced changes in the brain-gut axis to ameliorate chronic visceral and somatic hypersensitivity. *Neurobiol Stress* 28: 100590.
<https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2023.100590>

The Influence of Social Isolation and Enriched Environment on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical (HPA) Axis, Pain Sensitivity, and Behavior in Rats after Exposure to an Ulcerogenic Stressor

© 2024 N. I. Yarushkina^{a, *}, M. Yu. Zenko^a, O. Yu. Morozova^a, O. P. Komkova^a,
K. A. Baranova^a, S. E. Zhuikova^a, E. A. Rybnikova^a, and L. P. Filaretova^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: yarushkinani@infran.ru*

The results we obtained earlier indicate the potential for corrective effects on the negative consequences of social isolation on the functioning of the body through an enriched environment. The aim of the present study was to investigate the influence of housing conditions for rats – standard conditions, social isolation, and an enriched environment – on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, focusing on HPA axis stress reactivity, pain sensitivity, and rat behavior following exposure to an ulcerogenic stressor. The experiments were conducted on male Sprague-Dawley rats. Thirty-day-old rats, after being weaned from their mothers, were placed in different housing conditions for four weeks: standard environment (SE), isolation (SI), or an enriched environment (EE). After four weeks, rats from each group were exposed to an ulcerogenic stressor (US): 3 hours of cold immobilization (10 °C). Starting the day after US exposure, for one week, all groups of rats were sequentially assessed for somatic pain sensitivity (in the “hot plate” test), behavior (in the “open field” and “elevated plus maze” tests), and HPA stress reactivity (based on corticosterone levels in response to mild procedural stress). According to the results, SI conditions in our experimental setup led to a faster increase in body weight with age, higher anxiety levels, depressive-like reactions in half of the animals studied, and increased sensitivity to painful stimuli. At the same time, rats kept in the EE showed higher HPA axis stress reactivity, greater motor and exploratory activity, lower anxiety, and lower sensitivity to painful stimuli. The obtained results provide new evidence supporting our previous conclusion that SI exerts maladaptive effects on the overall functional state of the rats' bodies, while EE, on the contrary, leads to adaptive changes in the body. This study highlights the importance of an integrative approach when studying the effects of SI and EE on the body.

Keywords: social isolation, enriched environment, stress, glucocorticoid hormones, stress reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system, gastric erosions, behavior, pain sensitivity, rats

ОТ РЕДАКЦИИ

ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА НИНЫ КОНСТАНТИНОВНЫ ПОПОВОЙ

(10 ФЕВРАЛЯ 1929 г. – 28 СЕНТЯБРЯ 2024 г.)



28 сентября 2024 года ушла из жизни д.м.н., профессор Попова Нина Константиновна, признанный во всем мире специалист в области нейрогеномики поведения.

Научная карьера Н.К. Поповой началась в Казахском государственном медицинском институте, который она закончила в 1953 году. После обучения Н.К. Попова работала ассистентом в Карагандинском медицинском институте, а затем младшим научным сотрудником в Институте экспериментальной биологии и медицины СО АН СССР. Дальнейшая научная жизнь Н.К. Поповой была тесно связана с Институтом цитологии и генетики СО РАН, где с 1970 по 2013 год она заведовала Лабораторией нейрогеномики поведения. С 2013 года до настоящего времени Нина Константиновна продолжала работать в той же лаборатории в должности главного научного сотрудника.

Н.К. Попова – основатель оригинального научного направления физиологической генетики, посвященного изучению медиаторов мозга в молекулярно-генетической регуляции нормального и патологического поведения. Ею опубликовано более 300 научных работ, в том числе более 200 в международных изданиях. В базе данных Web of Science зарегистрирована 291 статья Н.К. Поповой, количество цитирований – 3978, индекс Хирша – 33.

В исследованиях Н.К. Поповой и работах возглавляемого ею коллектива выявлены особенности генетического контроля различных видов защитного поведения. Впервые установлено, что доместикация животных связана со значительными изменениями в метаболизме и рецепции основных регуляторов эмоциональности и агрессивного поведения – серотониновой и дофаминовой системах мозга. Большой цикл исследований Нины Константиновны посвящен эволюционным и онтогенетическим аспектам изучения нейромедиатора серотонина. В последние годы под ее руководством были получены значимые данные о роли взаимодействия биогенных аминов и нейротрофических факторов мозга в механизмах нормального и патологического поведения.

Работы Н.К. Поповой получили международное признание. Она была организатором двух Всесоюзных симпозиумов «Медиаторы в генетической регуляции поведения» (Новосибирск, 1986, 1988) и членом Оргкомитета Всесоюзных конференций по экологической физиологии и нескольких съездов физиологов Сибири. Н.К. Попова в течение ряда лет была членом редколлегии «Сибирского биологического журнала», журнала «Нейрохимия», а также международных журналов “News in Physiological Sciences” (США) и “Biogenic Amines” (Франция). В течение 15 лет Нина Константиновна входила в состав редколлегии «Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова», где осуществляла большую работу по улучшению качества публикаций, стремилась привлекать авторов, получивших интересные данные в различных областях современной физиологии.

Н.К. Попова – руководитель ряда грантов РФФИ и РНФ, грантов РАН «Фундаментальные науки – медицине» и «Молекулярная и клеточная биология», нескольких грантов СО РАН «Интеграция» и ГНТП «Приоритетные направления генетики». На протяжении многих лет Н.К. Попова на высоком методическом и научном уровне читала в Новосибирском государственном университете курс лекций «Биологически активные вещества», была руководителем большого числа дипломных работ. Длительное время Нина Константиновна была председателем Новосибирского отделения Всесоюзного общества фармакологов. Под ее руководством успешно защищены 29 кандидатских и 6 докторских диссертаций. За заслуги в развитии приоритетного направления в области физиологической генетики, в воспитании и подготовке научных кадров Н.К. Поповой в 1998 г. было присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации». Н.К. Попова на протяжении многих лет являлась экспертом РНФ, РФФИ, рецензентом в ведущих отечественных и ряде международных журналов, членом Совета по грантам Правительства РФ, членом международных обществ International Brain and Behavioral Society (IBANGS), Serotonin Club.

Жизнелюбие, активность, остроумие, интеллигентность и всеобъемлющая доброта Нины Константиновны служили ориентиром для окружающих ее учеников и коллег, для всех родных и близких. В наших воспоминаниях она навечно останется великим ученым и мудрым наставником, всегда готовым оказать помощь. Мы все скорбим о постигшей нас утрате. Память о Нине Константиновне навечно останется в наших сердцах и стенах Института цитологии и генетики СО РАН.

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ № ФС77-67154 от 16 сентября 2016 г. выдано Федеральной службой
по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых
коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати г. Дата выхода в свет г.

Формат 70 × 100¹/₁₆ Усл. печ. л. Уч.-изд. л.

Тираж экз. Зак. Цена свободная

Учредитель: Российская академия наук

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14
Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24: ФГБУ «Издательство «Наука»

121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.

Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»

121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1

Индекс 39396

ISSN 0869-8139 Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2024, том 110, № 9