

ISSN 1027-8133

Том 41, Номер 3

Июль – Август – Сентябрь
2024



НЕЙРОХИМИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 3, 2024

Специальный выпуск памяти Н. Н. Дыгало

(спецвыпуск, часть 1)

Редакторы Г. Т. Шишкина, Т. С. Калинина

Специальный выпуск журнала “Нейрохимия” памяти Н. Н. Дыгало <i>Н. В. Гуляева</i>	207
Николай Николаевич Дыгало в воспоминаниях учеников и друзей-коллег, работающих в ИЦИГ СО РАН <i>Н. М. Бажан, Т. С. Калинина, А. В. Куликов, Д. А. Ланшаков, А. Л. Маркель, В. С. Науменко, А. С. Цыбко, Г. Т. Шишкина, Н. С. Юдин</i>	208

Обзоры

Резистентность мозга к инсулину при неврологических нарушениях различного генеза: современное состояние и подходы к лечению <i>И. И. Зорина, А. О. Шпаков</i>	215
---	-----

Экспериментальные работы

Снижение экспрессии BCL-XL в гиппокампе крыс ассоциировано с депрессивно-подобным фенотипом <i>Г. Т. Шишкина, Д. А. Ланшаков, А. В. Баннова, Н. П. Комышева, Н. Н. Дыгало</i>	231
Дексаметазон снижает уровни мРНК цитокинов и активность микроглии в стволе мозга новорожденных крыс <i>Т. С. Калинина, В. В. Булыгина, Д. А. Ланшаков, Е. В. Сухарева, Н. Н. Дыгало</i>	240
Экспрессия про- и зрелого мозгового нейротрофического фактора мозга и белка Bcl-xL в гиппокампе неонатальных крыс при введении дексаметазона <i>В. В. Булыгина, Т. С. Калинина, Д. А. Ланшаков, П. Н. Меньшанов, Е. В. Сухарева, Н. Н. Дыгало</i>	247
Экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в различных типах клеток гиппокампа и коры неонатальных крыс <i>Д. А. Ланшаков, У. С. Дрозд, Н. Н. Дыгало</i>	257
Влияние ингибитора фермента синтеза серотонина параклорфенилаланина на дофаминовую систему мозга мышей каталептической линии <i>Д. В. Базовкина, Е. Ю. Баженова, А. В. Куликов</i>	266
Влияние длительного воздействия хлорида марганца на метаболизм серотонина в мозге и регулируемое серотонином поведение рыб вида <i>Danio Rerio</i> <i>А. Е. Изъюров, И. Е. Сорокин, В. С. Евсюкова, Д. А. Золотова, П. А. Куликов, А. В. Куликов</i>	276
Анксиогенный эффект пентилентетразола в субконвульсивной дозе сопровождается снижением пролиферации клеток и экспрессии нейрональной NO-синтазы в заднем гиппокампе <i>В. А. Аниол, М. Ю. Степаничев, А. А. Яковлев, Н. А. Лазарева, Н. В. Гуляева</i>	285

Регулярные статьи

Методы

Простой метод оценки морфологических характеристик астроцитов: выявление полового диморфизма динамики созревания астроцитов в миндалине крыс

*А. О. Манолова, Н. А. Лазарева, А. Э. Парамонова, А. А. Квичанский, М. С. Одринская,
М. Ю. Степаничев, Н. В. Гуляева*

294

Клиническая нейрохимия

Сравнение методов выделения экстраклеточных везикул из сыворотки крови человека

А. А. Яковлев, Т. А. Дружкова, Н. А. Соловьева, А. Б. Гехт, Н. В. Гуляева

302

Contents

Vol. 41, no. 3, 2024

Special Issue: A Tribute to Nikolay N. Dygalo

(Special Issue, Part 1)

Eds. G. T. Shishkina and T. S. Kalinina

Special Issue of the Journal “Neirokhimiya”: A Tribute to Nikolay N. Dygalo <i>N. V. Gulyaeva</i>	207
Nikolay Nikolaevich Dygalo in Memories of Students and Friends-Colleagues Working at ICG SB RAS <i>N. M. Bazhan, T. S. Kalinina, A. V. Kulikov, D. A. Lanshakov, A. L. Markel, V. S. Naumenko, A. S. Tsybko, G. T. Shishkina, and N. S. Yudin</i>	208

Review Articles

Brain Insulin Resistance in Neurological Disorders of Various Genesis: Current State and Treatment Approaches <i>I. I. Zorina and A. O. Shpakov</i>	215
--	-----

Experimental Articles

A Reduced Expression of BCL-XL in the Hippocampus is Accompanied by a Depression-Like Phenotype in Rats <i>G. T. Shishkina, D. A. Lanshakov, A. V. Bannova, N. P. Komysheva, and N. N. Dygalo</i>	231
Dexamethasone Reduces Cytokine mRNA Levels and Microglial Activity in the Brainstem of Newborn Rats <i>T. S. Kalinina, V. V. Bulygina, D. A. Lanshakov, E. V. Sukhareva, and N. N. Dygalo</i>	240
Expression of Pro- and Mature Brain Neurotrophic Factor and Bcl-xL in the Hippocampus of Neonatal Rats under Dexamethasone Treatment <i>V. V. Bulygina, T. S. Kalinina, D. A. Lanshakov, E. V. Suhareva, and N. N. Dygalo</i>	247
Glucocorticoid Receptor Expression in the Different Cell Types of the Neonatal Rat Hippocampus and Cortex <i>D. A. Lanshakov, U. S. Drozd, and N. N. Dygalo</i>	257
Effects of Prolonged Exposure to Manganese Chloride on the Brain Serotonin Metabolism and Serotonin-Regulated Behavior in Zebrafish <i>A. E. Izyurov, I. E. Sorokin, V. S. Evsiukova, D. A. Zolotova, P. A. Kulikov, and A. V. Kulikov</i>	266
Effect of Parachlorophenylalanine, an Inhibitor of the Serotonin Synthesis Enzyme, on the Brain Dopamine System of Cataleptic Mice <i>D. V. Bazovkina, E. Yu. Bazhenova, and A. V. Kulikov</i>	276
Anxiogenic Effect of Pentylenetetrazole in a Subconvulsive Dose is Accompanied by Decreased Cellular Proliferation and Neuronal NO-Synthase Expression in the Posterior Portion of the Hippocampus <i>V. A. Aniol, M. Yu. Stepanichev, A. A. Yakovlev, N. A. Lazareva, and N. V. Gulyaeva</i>	285

Regular Articles

Methods

A Simple Method for Morphological Assessment of Astrocytes: Sexual Dimorphism in The Maturation Dynamics of Astrocytes in the Rat Amygdala

A. O. Manolova, N. A. Lazareva, A. E. Paramonova, A. A. Kvichansky, M. S. Odrinskaya, M. Yu. Stepanichev, and N. V. Gulyaeva

294

Clinical Neurochemistry

Comparison of Methods for Isolation of Extracellular Vesicles from Human Serum

A. A. Yakovlev, T. A. Druzhkova, N. A. Solovyeva, A. B. Guekht, and N. V. Gulyaeva

302

СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК ЖУРНАЛА “НЕЙРОХИМИЯ” ПАМЯТИ Н. Н. ДЫГАЛО

© 2024 г. Н. В. Гуляева¹, *

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*E-mail: nata_gul@ihna.ru

Николай Николаевич Дыгало был признанным ученым мирового уровня в области нейробиологии; его исследования существенно обогатили разные области этой обширной науки, в первую очередь, нейроэндокринологию. Нас с Николаем Николаевичем долгие годы связывали очень добрые профессионально-дружеские отношения, несколько завершённых серьёзных совместных научных проектов. Наряду с позитивными научными контактами, основанными на общих интересах и представлениях о том, каким образом наш мозг преодолевает тяжёлые ситуации, всегда присутствовала “роскошь человеческого общения”, как это называл Сент-Экзюпери. Николай Николаевич был человеком особенным, удивительно позитивным и мудрым, и заряжал этим позитивом (что ценно всегда и особенно в наши непростые времена). Когда пришла печальная весть о том, что его не стало, одной из первых была мысль о том, чтобы достойно увековечить его память. Николай Николаевич многие годы был членом редколлегии журнала “Нейрохимия”/Neurochemical Journal, и спецвыпуск журнала, посвящённый его памяти, мог бы быть заслуженной данью нашего уважения и признания. Коллеги и ученики активно поддерживали эту идею.

Сегодня высокий уровень ученого никому доказывать не нужно – нужно просто найти его работы на просторах аккумулирующего всю информацию интернета. Поэтому новое знание, добытое Николаем Николаевичем с коллегами, всегда будет доступно будущим поколениям ученых. Иная ситуация с пониманием, каким человеком был ученый – если о нем не расскажут те, кто его знал, эта информация просто исчезнет. Поэтому открывает этот спецвыпуск статья воспоминаний коллег, учеников и друзей Николая Николаевича. Научную часть выпуска составляют статьи ученых-нейробиологов, в первую очередь продолжателей дела Николая Николаевича, представителей новосибирской школы, которые развивают его идеи.

Завершая это краткое вступление известным стихотворением В.А. Жуковского “Воспоминание”. Написанное два столетия назад (в 1821 году), оно полностью передает то, что чувствую сейчас, вспоминая Николая Николаевича:

*О милых спутниках, которые наш свет
Своим соуптствием для нас животворили,
Не говори с тоской: их нет;
Но с благодарностию: были.*

НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ ДЫГАЛО В ВОСПОМИНАНИЯХ УЧЕНИКОВ И ДРУЗЕЙ-КОЛЛЕГ, РАБОТАЮЩИХ В ИЦИГ СО РАН

© 2024 г. Н. М. Бажан¹, Т. С. Калинина¹, А. В. Куликов¹, Д. А. Ланшаков¹, А. Л. Маркель¹,
В. С. Науменко¹, А. С. Цыбко¹, Г. Т. Шишкина^{1,*}, Н. С. Юдин¹

¹ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

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

ПРЕДИСЛОВИЕ – КАК ВСЕ НАЧИНАЛОСЬ (Г.Т. Шишкина)

Шишкина Галина Трифоновна: Николай Николаевич Дыгало родился 09 августа 1952 года в городе Барнауле Алтайского края. После школы (в 1969 году) поступил в Новосибирский государственный университет, который окончил в 1974 году. Вся его дальнейшая жизнь была связана с одним Институтом – цитологии и генетики СО РАН, и одной лабораторией этого Института, организованной и долгое время руководимой блестящим ученым профессором Евгением Владимировичем Науменко. Как в родной лаборатории, так и в коллективе трех, как их называли, родственных лабораторий, включая лаборатории Людмилы Николаевны Ивановой и Нины Константиновны Поповой, благодаря нашим учителям, университетской школе, особой атмосфере городка сложился общий интерес к проводимой нами работе. Чего стоили только межлабораторные семинары, на которых в жарких спорах формировалось наше мировоззрение. Не удивительно, что почти весь



Рис. 1. Е.В. Науменко, Н.Н. Дыгало и А.Л. Маркель (докладчик) на Всесоюзной конференции с международным участием “Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса”, проведенной в Новосибирске 1988 г.

первый состав научных сотрудников лаборатории Е.В. Науменко защитил докторские диссертации. В 1988 году впервые на базе лаборатории провели Всесоюзную конференцию с международным участием, на которой было сделано 70 докладов исследователями из 12 отечественных городов, а также из Чехословакии, Венгрии, ГДР и Польши



Рис. 2. Участники этой же конференции 1988 г., которые не поленились сфотографироваться вместе.



Рис. 3. Любимое животное.

(рис. 1, 2), и, помимо тезисов [1], был издан сборник некоторых выбранных докладов [2].

Многочисленные встречи на этой, а также последующих отечественных и зарубежных конференциях создали общий круг исследователей, объединенных научными и дружескими связями. Но главное — наука, споры, общение и, конечно, работа кипели в лаборатории.

Из дополнительных увлечений НН можно отметить его любовь к лошадям (рис. 3) и горным вершинам (рис. 4).

Еще Николай Николаевич очень любил рифмовать строки, в том числе, и с философским подтекстом. Как-то в связи с собственным днем рождения его осенило: “Как ни крути, а день рождения — В мир этот нашего явления — Приятен тем и знаменит — Что с ним у нас весь белый свет — А без него нас просто нет!”



Рис. 4. На очередной горной вершине. Многие годы эти “горные походы” организовывал и возглавлял Дмитрий Георгиевич Кнорре.

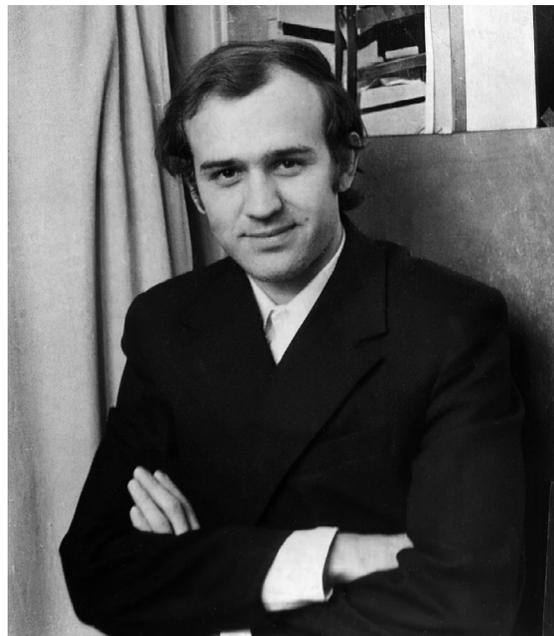


Рис. 5. В начале пути.

Ушедшие люди продолжают жить среди нас в воспоминаниях. Ниже представлены воспоминания о НН некоторых учеников и коллег, работающих в ИЦиГ СО РАН. Мне же хотелось бы закончить свое короткое предисловие еще одним подходящим к этому случаю четверостишием Николая

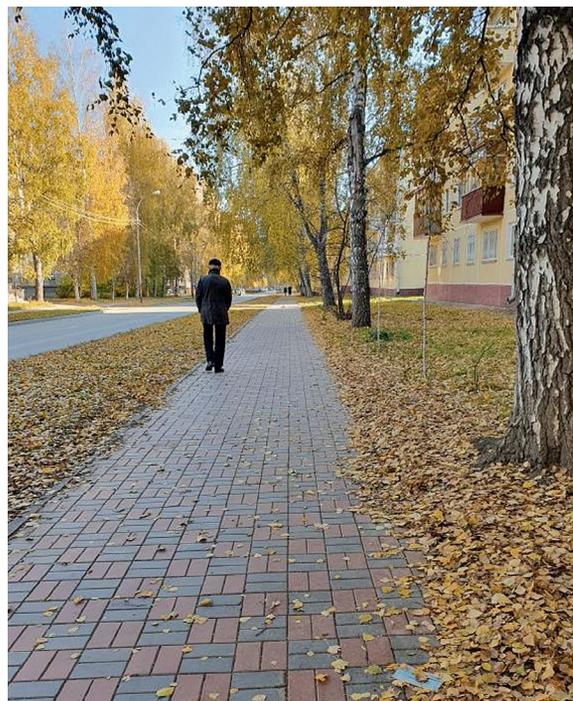


Рис. 6. Любимый Академгородок.

Николаевича: “Нам каждому дано пройти путь лишь один. – Деталям нет числа, их дарит нам судьба. – Но каждый господин той памяти, что с ним – Пребудет навсегда в грядущие века” (рис. 5, 6).

ВОСПОМИНАНИЯ УЧЕНИКОВ

(Н.С. Юдин, Д.А. Ланшаков, Т.С. Калинина)

Юдин Николай Серафимович: Я хорошо запомнил свою первую встречу с Николаем Николаевичем. В сентябре 1985 года, начав уже учиться на пятом курсе НГУ, я глубоко разочаровался в биологии и решил перевестись в медицинский институт. Там посмотрели мою зачётку и сказали, что перевести меня могут только на первый курс и с обязательной пересдачей всех предметов. Я впал в отчаяние, но случайная встреча с сотрудницей кафедры физиологии НГУ Марией Сергеевной Виноградовой предопределила всю мою последующую жизнь. После её звонка, в конце рабочего дня я пришёл в ИЦиГ к заведующему лабораторией Е.В. Науменко и был представлен Николаю Николаевичу. Он мельком взглянул на меня и сказал: “Приходи завтра в виварий к двенадцати часам – будем рассаживать крыс”. На следующий день в виварий я шёл мимо студенческой столовой и решил, что вполне успею перекусить и только чуть-чуть опоздаю. Вроде небольшая очередь, но двигалась так медленно, что в виварий я, сгорая от стыда, явился уже во втором часу. Николай Николаевич не сказал ни слова, но его испепеляющий взгляд я помню до сих пор. Если бы не его выдержка, наше знакомство могло закончиться тогда, даже не начавшись.

Николай Николаевич помог мне начать свой путь в науке на личном примере. Цикл нашей научной работы выглядел следующим образом. В году мы проводили две серии экспериментов – зимой и летом. Считалось, что весной и осенью у животных меняется состояние организма, поэтому работать на них нельзя. Поэтому, в среднем, за год у научного сотрудника накапливался материал на одну-две статьи.

Каждую субботу в библиотеке ГПНТБ, напротив НГУ, обновляли выставку из нескольких десятков свежих научных журналов. Нужно было прийти, пролистать все журналы на предмет статей, относящихся к твоей теме, и заказать их оттиски. Поскольку ксероксов ещё не было, то оттиск в единственном экземпляре делали в библиотеке. Потом оттиски хранили в лаборатории, и их можно было взять почитать под роспись, как в библиотеке. На выставке также был специальный журнал *Current Contents*. В нём печатались списки статей из сотен научных журналов вместе с адресами авторов. Если статья выходила в журнале, которого не было в ГПНТБ, то можно было заполнить специальную карточку с просьбой прислать её оттиск и отправить автору по почте. Если повезёт, то через пару месяцев в ИЦиГ приходил конверт с “авторским”

экземпляром. Николай Николаевич часто меня спрашивал: “Коля, а ты видел последнюю статью такого-то в журнале таком-то? Ну и что там написано?” Хочешь не хочешь, а при такой системе ты был в курсе всех научных новостей. Работе с литературой он отводил огромное значение. Весь рабочий стол Николая Николаевича был завален оттисками и рабочими журналами. Помню, он часто ворчал, что журнал по поведению у нас был заляпан мышинным пометом, журнал по биохимии был в пятнах крови, а журнал по измерению тирозингидроксилазы был в дырках, прожжённых едкой щёлочью. Ещё у каждого из нас на столе стояла картотека – такой красивый ящик из оргстекла. Туда мы складывали небольшие карточки, на которых писали библиографические данные статьи, а на обороте – её краткое содержание. За десять лет до появления первых компьютеров, эти карточки были незаменимы при написании собственных публикаций. По совету Николая Николаевича, первые статьи на английском я переводил письменно со словарём, практически дословно. За год получалось несколько общих тетрадей, но благодаря этому я быстро усвоил нужную терминологию.

Тема моей будущей диссертации была связана с изучением активности фермента тирозингидроксилазы в мозге взрослых мышей после введения матери гормона кортикостерона. Гормон нужно было вводить мышам точно в определённые дни беременности. Но мыши, как назло, становились беременными перед праздниками и выходными. Как-то раз, мы с Николаем Николаевичем пошли в виварий делать мышам уколы сразу после первой демонстрации...

Методику измерения активности тирозингидроксилазы Николай Николаевич поставил сам, за год до моего появления в лаборатории. Методика была сложная, состояла из нескольких стадий, которые нужно было проделывать в максимальном темпе, чтобы не потерять драгоценный биоматериал. На этот счёт шеф любил повторять, что экспериментальные данные лучше всего хранятся в двух видах – в голове у живой мыши и в виде цифр в лабораторном журнале. Все переходные этапы следовало, по возможности, максимально ускорить. Обычный день начинался с того, что я нумеровал несколько штативов со стеклянными пробирками, готовил скоропортящиеся растворы и гомогенизаторы. Стеклогенераторы заказывали у стеклодува, и они были индивидуальными – к каждому гомогенизатору нужно было подобрать пестик, чтобы он не “звенел” при встряхивании. Потом мы с Николаем Николаевичем одевали телогрейки и забирались на 1–2 часа в холодной комнате для “растирки” мышинных мозгов. В ходе последующих манипуляций, в каждую пробу нужно было засыпать по несколько миллиграмм окиси алюминия. Сначала я мучился, многократно

взвешивая алюминий на рычажных весах, а потом, по совету Николая Николаевича, сделал “черпак” из иглы для шприца и дело пошло гораздо быстрее. Последний этап — измерение флюоресценции на приборе “Хитачи” мы часто заканчивали уже поздно вечером. Столовая “Улыбка” закрывалась в десять вечера, все магазины закрывались ещё раньше, так что я нередко оставался голодным. В такой ситуации Николай Николаевич приводил меня домой, и мы ужинали с ним на кухне, поскольку все домашние уже спали.

Потом наступал этап статистической обработки результатов. Николай Николаевич очень требовательно относился к статистике. Одной из первых книг, которые он дал мне прочесть, была “Статистические методы в биологии” Бейли. Критерий Стьюдента мы считали на советской ЭВМ, которая была копией американской “Барроуз”. А вот для дисперсионного анализа приходилось набивать цифры на бумажную перфоленту и нести её в Вычислительный центр ИЦиГ. И каждый раз, когда я получал выдачу с машины, сердце замирало — будут или нет статистические различия между группами?

Наконец наступал завершающий этап — написание статьи. Помню, свои первые тезисы на конференцию, объемом в одну страничку, я писал примерно месяц. Возвращая мне очередной исчерканный вариант, Николай Николаевич говорил что-то типа “рыхло”, “вяло”, “неубедительно”, “много воды” и т.д. Сам он любил писать кохиноровским карандашом с резинкой. Напишет фразу и тут же начинает что-то стирать, подбирать слова, оттачивать формулировки. В качестве примера как не надо писать, он часто цитировал мне заумный термин из какой-то монографии — “прематурационная аутомодификация функционального ответа”. Сейчас в это трудно поверить, но в 80-х статьи писали с помощью ножниц и клея. Первый вариант писали на листах А4, потом вырезали удачные куски и приклеивали их на новом листе в нужном порядке. Потом статью представляли на межлабораторном семинаре, но предварительно ее читал профессор Е.В. Науменко и рецензент — кто-то из сотрудников. Для этого текст перепечатывали на механической пишущей машинке для “черновиков”. Для “чистовиков” в лаборатории стояли две электрические пишущие машинки. В машинку можно было засунуть пять листов бумаги с “копиркой”, но читабельными были только первых два листа, которые и отправляли в редакцию. Каждую опечатку приходилось замазывать белым “штрихом”. Особая сноровка требовалась, когда в русском тексте нужно было напечатать что-нибудь по-английски. Сначала печатали русский текст и в нужном месте делали пробелы по числу английских букв. Затем пачку листов переносили в английскую машинку и допечатывали на ней.

Отдельно хочу рассказать об организаторском таланте Николая Николаевича. Примерно в 1988 году он уговорил Е.В. Науменко провести на базе лаборатории международную конференцию “Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса”. Примерно год у него ушёл на переписку с коллегами. В Новосибирск приехали все видные ученые в этой области из СССР и социалистических стран. Николай Николаевич занимался их размещением, арендой зала, публикацией тезисов и много чем ещё. В стране уже был повальный дефицит всего, включая пищевые продукты. Я как-то увидел у него на столе письмо на имя зампредседателя СО РАН с просьбой выделить 10 банок растворимого кофе (!) для проведения конференции.

Свой очерк об этом замечательном человеке и о чувствах, которые у меня возникают сейчас при мыслях о нём, я хочу закончить бессмертными строчками Андрея Дементьева: “Не смейте забывать учителей. — Пусть будет жизнь достойна их усилий. — Учителями славится Россия. — Ученики приносят славу ей. — Не смейте забывать учителей!”

Ланишаков Дмитрий Александрович: Николай Николаевич был яркой личностью. Его лекции всегда были интересными, он заражал своим пристрастием к науке. Его видение современной Физиологии было комплексным. Как заведующий кафедрой он постоянно старался пригласить выдающихся преподавателей. Для своего спецкурса он всегда выбирал авангардные моменты на передовом крае исследований. Поэтому проходить дипломную практику я захотел именно в его лаборатории. Работая над дипломом, я был впечатлен четкостью организации и слаженностью при заборе материала. В лаборатории кипела работа. Николай Николаевич отправил меня, ещё студента последнего курса в первую в моей жизни командировку в Санкт-Петербург. Позже мы вместе работали над текстом дипломной работы. Николай Николаевич всегда мог вычленять самое главное и сформулировать проблематику, и всегда учил этому нас — своих учеников.

Калинина Татьяна Сергеевна: “Жизнь — это не те дни, что прожиты, а те, что запомнены” (Г. Маркес). Мне повезло, что весь мой путь в науке, да и сам выбор этого пути прошел под влиянием такой сильной и яркой личности, которым был и остается для меня Николай Николаевич Дыгало. Этот человек всегда был лидером и примером служения науке. Придя в 437 комнату корпуса ИЦиГ на ВЦ в далеком 1985 году в качестве студентки, ищущей руководителя для дипломной практики, я неведомо каким чувством поняла, что это именно то место, где мне будет безусловно интересно. Как выбирает студент руководителя? Это загадка и магия... Верного алгоритма нет, есть интуитивные ощущения..., и они полностью оправдались! С НН было интересно всегда. В годы студенчества — на определении

активности тирозингидроксилазы *in vitro* (шесть наборов разномастной стеклянной посуды, многостадийная методика на целый день, замеры на спектрофлуориметре, расположенном в другом корпусе), при работе с животными в виварии, абсолютно все было полноценно, с самоотдачей, подробным разъяснением непонятных для меня методических тонкостей. «Татьяна, боль в душе храня, не обижайся на меня, – Когда библиотечный день меняю на замеров лень. – Не надо думать: “Лишь трясти?!” – С улыбкой в зеркальце взгляни – и улыбнись! – Долой печаль! Прекрасна Жизнь!» – из поздравительной открытки от НН на 8 Марта в мои студенческие годы...

Много воды утекло с тех пор..., и всегда НН был в авангарде новых подходов и новых методов. Это сейчас метод реверсивной ПЦР, да еще и в реальном времени, делают на каждом углу и во всех лабораториях. А в далеком 97-98 гг. ПЦР с обратной транскрипцией, да не из культуры клеток, а из образцов мозга, на практически самодельных амплификаторах с водяным охлаждением было суперновым методом. «Татьяна, ты – в мечту поверь и что-нибудь “отпещеэрь”», и еще: “Когда вокруг одни заботы – Студенты, дети громко плачут... Татьяна, Вы спасете нас, амплифицируя удачу!” И выбор этого подхода в нашей лаборатории для определения экспрессии нейрогенов был сделан именно благодаря НН.

После РТ-ПЦР было и введение антисмысловых олигонуклеотидов, и применение РНК-интерференции, и, наконец, самые современные методы – опто- и хемогенетическая активация нейронов определенной “эргичности” в отделах мозга.

Быть причастным к применению новых передовых подходов – большая честь для всех учеников НН, это настоящее везение – учиться у настоящего ученого, беззаветно преданного науке, впитывать его мировоззрение. Широка взглядов НН всегда меня восхищала. Его эрудиция в вопросах истории, культуры, литературы, музыки была потрясающей. Я бесконечно благодарна судьбе за все годы, проведенные рядом, за настоящее наставничество, за любовь к жизни и преданность науке, за тот яркий след, который НН оставил в моем сердце и который просто не имеет права погаснуть...

ВОСПОМИНАНИЯ ДРУЗЕЙ-КОЛЛЕГ

(Н.М. Бажан, А.С. Цыбко, А.В. Куликов,
В.С. Науменко, А.Л. Маркель)

Бажан Надежда Михайловна: Я звала его по имени отчеству только в официальной обстановке, а так по жизни я звала его Коля, а он меня – Надежда. Это повелось с тех пор, когда он проходил практику в Институте цитологии и генетики как студент, а я была уже аспиранткой. Коля был веселым человеком, весёлым и остроумным. Мне нравилось слушать его рассказы о жизни. Мы работали в разных, но очень близких по духу

и месторасположению лабораториях. Иногда он появлялся у нас в конце рабочего дня совершенно неожиданно и расспрашивал, как идут дела, и чем мы сейчас занимаемся по науке. И сам рассказывал свои короткие рассказы про Украину, про Барнаул, где жили его родители, про направления в науке физиологии. Никогда не забуду его образное сравнение, что ученые кидаются на какую-нибудь модную тему как стайки рыб в аквариуме кидаются к тому месту, где дают корм. Потом мода проходит, и рыбки отправляются в свободное плавание, пока не появляется новая “мода”.

Коля был выдающимся ученым, потому что выдался из наших рядов своей страстью к использованию самых последних молекулярно-генетических методов, которые появлялись в арсенале физиологов. Под его руководством, он и его сотрудники первыми среди физиологов стали использовать антисмысловые РНК, измерения уровня мРНК генов, вовлеченных в регуляцию физиологических процессов, методом ПЦР в реальном времени, методы оптогенетики и др. Некоторые из этих “пионерских” испытаний так и не дошли до широких народных масс, а другими постепенно овладели все физиологические лаборатории. У нас никогда не было с ним совместных работ, но мне доставляло удовольствие слушать его доклады на Отчетных сессиях института. Он был научным лидером, за которым шли его сотрудники, к которому всегда прислушивались мы – сотрудники других лабораторий. Еще нас объединяло то, что мы долгие годы работали в рамках одного межлабораторного физиологического семинара. Руководил работой семинара триумvirат: профессора Науменко Е.В., Попова Н.К. и Иванова Л.Н. На этом семинаре мы должны были докладывать не только диссертации, но и статьи перед их отправкой в редакцию. Этот семинар был хорошей школой жизни, в которой мы все вместе учились и учили.

Отдельно хочется вспомнить, как Коля работал в качестве заведующего кафедрой физиологии на факультете естественных наук НГУ. Он стал заведовать кафедрой физиологии, которая имела свою славную долгую историю, устоявшуюся учебную программу и традиции. Не покушаясь на традиции, Коля принялся модифицировать (насколько это возможно в строгих рамках утвержденного учебного плана) список спецкурсов. Его главная цель была дать студентам самые современные представления о физиологии, о роли молекулярной иммунологии в физиологических методах, о новых горизонтах нейрогеномики и т.д. Во время заседания кафедры, когда мы заслушивали дипломные работы студентов, он проявлял изрядный дуализм. С одной стороны, он очень строго спрашивал студентов, а с другой стороны, когда мы обсуждали потом оценки этим студентам, всегда вставал на их сторону и защищал их интерес. Он был добрым человеком.

Большое видится на расстоянии. Время с каждым днем увеличивает расстояние между нами и Николаем Николаевичем Дыгалом. И я без преувеличения могу сказать, что он был “лицом” современной российской физиологии и самым крупным физиологом в Сибири и на Дальнем Востоке.

Цыбко Антон Сергеевич: “Проверьте свои программы, чтобы никакого парабиоза Введенского там не было!” – призывал Николай Николаевич каждый год на сентябрьском собрании кафедры физиологии. Почему-то мне это очень сильно запомнилось. Безусловно, Николай Николаевич был открыт для новых идей. От нейроэндокринологии до хемогенетики он всегда шёл в ногу с нейронаукой. Но Николай Николаевич не был механически за всё новое против всего старого, просто он чётко осознавал, если за старой идеей ничего не стоит, в науке ей не место. Не в его духе было преклоняться перед авторитетами и концепциями просто “из уважения”. Для меня важно, что его открытость новому обусловила и то, что я пришёл в преподавание. Будучи избран на должность заведующего кафедрой физиологии, Николай Николаевич захотел “омолодить” преподавательский состав, добавить новых спецкурсов, из которых студенты могли бы почерпнуть свежие факты и идеи. Как сейчас помню июльский день 2016 года, когда я бесцеремонно влетел в его кабинет с предложением создать новый спецкурс. Тогда я был не очень хорошо знаком с Николаем Николаевичем и почему-то уверился в том, что он вежливо предложит мне опубликовать ещё с десяток статей, подрастить немного h-индекс, а уже потом приходиться с предложениями спецкурсов. Да, таково было мое предубеждение. Но как же я ошибался! С энтузиазмом выслушав мой “концепт” спецкурса, он предложил прислать примерный список тем, и после мы ещё несколько раз встречались и обсуждали содержание спецкурса. Николай Николаевич был харизматичным человеком, с широчайшей эрудицией, прекрасный рассказчик. Трудно было не подпасть под его обаяние. Признаюсь, чувствовал я пару раз уколы совести за то, что по незнанию мог подозревать Николая Николаевича в высокомерии, которое иногда свойственно крупным учёным. Что касается спецкурса, то тогда я ещё не подозревал, какой большой труд мне предстоит проделать. Десять лекций нужно было создать с нуля. Было пару раз желание всё бросить, но каждый раз вспоминал про выданный мне кредит доверия и довёл начатое до конца. И готовя курс, и каждый год его обновляя, я сам стал глубже и шире понимать нейронауку. И это тоже, кстати, в соответствии с заветами Николая Николаевича. Он поверил в меня, дал возможность реализовать себя в преподавании, стать интеллектуально богаче, и за это я всегда буду ему благодарен.

Куликов Александр Викторович. Идеологические основы научного успеха Николая Николаевича: Большое

научное наследие Николая Николаевича зафиксировано в многочисленных статьях в престижных отечественных и международных изданиях и хорошо известно широкому кругу отечественных и зарубежных физиологов и нейроэндокринологов. Однако мало кто знает об идеологической основе этих научных достижений, поскольку Николай Николаевич, по-видимому, считал себя некомпетентным делать свои принципы научного исследования достоянием научной общественности. Действительно, он был физиологом, а не философом. Однако в кругу близких коллег он время от времени высказывал свой подход к научному познанию, особенно не акцентируя на этом внимание. Пользуясь предоставленной мне возможностью, я хочу предложить научной общественности и особенно начинающим исследователям основные принципы, которые лежат в основе его успешной научной карьеры и которые он неоднократно высказывал в личной беседе. Сразу оговорюсь, что это мое изложение его принципов. Первый принцип: для научного успеха необходимо резко ограничить круг исследования, лучше быть признанным специалистом в узком вопросе, чем дилетантом во всем. Второй принцип: выбирай такую задачу, которую ты можешь четко сформулировать и однозначно экспериментально решить за ограниченное время (желательно за один цикл исследования), лучше полностью решить локальную проблему, чем добавить тумана в глобальную проблему, которая может быть и вообще не имеет решения. Третий (и самый важный) принцип: научный метод обладает такой мощью, что строгое использование его даже при изначально ложной посылке обязательно приведет к открытию истины. Николай Николаевич часто повторял: “Если будешь, строго используя научный метод, искать доказательства того, что земля плоская, то обязательно придешь к выводу, что она круглая”. Анализируя многочисленные работы Николая Николаевича, особенно опубликованные в рейтинговых журналах, я прослеживаю строгое соблюдение этих трех принципов. Эти принципы кажутся такими простыми и очевидными, но как мало исследователей строго им следуют из-за желания любой ценой разрекламировать свою (или, что хуже, чужую) идею, получить грант или просто “хайпануть”.

Науменко Владимир Сергеевич: Мое знакомство с Николаем Николаевичем Дыгалом произошло даже не на заре моей научной деятельности, а в раннем детстве, когда я, будучи внуком Евгения Владимировича Науменко, заведующего лабораторией, где работал Николай Николаевич, сопровождал их в путешествии по реке Обь, в рамках конференции, проводимой лабораторией. Обучаясь на факультете естественных наук Новосибирского государственного университета, я слушал лекции Николая Николаевича о структуре различных рецепторов и механизмах их действия в регуляции функции ЦНС,

что, отчасти, определило мои дальнейшие научные интересы. Позднее, уже во время моей работы в Лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН, при обсуждении результатов научных экспериментов, проводимых сначала мной, а потом и моими учениками в течении более чем двадцати лет, Николай Николаевич неизменно высказывал свои замечания. Его конструктивная критика всегда была обоснована и принималась нами во внимание. Заседания комиссии по оценке работ аспирантов-физиологов, которую Николай Николаевич бесценно возглавлял, всегда проходили в дружеской обстановке благодаря чувству юмора Николая Николаевича. Для меня Николай Николаевич всегда был примером интенсивно и эффективно работающего научного сотрудника: в его Лаборатории значительно раньше нашей были поставлены работы с генетическими конструктами для регуляции экспрессии генов в *in vivo* мозге и иммуногистохимический анализ, без которых современные нейробиологические работы выполнять становится все сложнее. С уходом Николая Николаевича мы потеряли важную часть сообщества нейробиологов и физиологических генетиков Института.

Маркель Аркадий Львович: Есть люди, о которых не получается думать и говорить в прошедшем времени даже тогда, когда они покидают этот мир... Таков Николай Дыгало! Почти половина века ознаменовалась присутствием в стенах ИЦиГ СО РАН ныне профессора д.б.н. чл.-корр. РАН Николая Николаевича Дыгало, а когда-то в самом начале его научной карьеры просто Дыгало, Коли-Николая, студента НГУ, старшего лаборанта, научного сотрудника, только начинающего свой блестящий путь в науку в лаборатории Центральной регуляции эндокринных функций, возглавляемой ученым с мировым именем, профессором-эндокринологом Евгением Владимировичем Науменко, передавшим в последние бразды правления лабораторией и блестящие ее традиции науки и жизни своему лучшему ученику и новатору в области нейроэндокринологии к тому времени уже доктору биологических наук Николаю Николаевичу Дыгало. Однако все начиналось значительно раньше, когда взошла первая заря на горизонте науки Николая Дыгало, который скорее всего благодаря врожденной любознательности, чутью истинного исследователя и неухаживающему стремлению к новизне нашел “золотой ключик” с прозаическим на первый взгляд названием – тирозингидроксилаза, который помог молодому ученому открыть заветную дверь в храм науки, именуемой нейробиологией в широком смысле этого слова. Все началось с малого, но закончилось (вернее, далеко не закончилось и будет продолжаться в работах многочисленных учеников и последователей) блестящими обобщениями, такими, например, как роль нейрохимической модуляции в формировании нейроконнектома [3], глюкокортикоидная

теория развития депрессии [4], эволюция эндокринной системы и гуморальный код [5] и другими. Одновременно ярко проявился талант Н.Н. Дыгало как новаторского методиста: он начал широко использовать новейшие и разработанные в лаборатории методы исследования функций мозга с помощью генетических инструментов, был пионером в нашей стране по использованию оптогенетических подходов для изучения поведения экспериментальных животных. Все это далеко не закончилось, и лаборатория по-прежнему остается Дыгаловской и идет по проложенному им пути. Николай Николаевич всегда был полон энергии, новых идей и замыслов, каким образом эти идеи материализовать. Все это делало его человеком незаурядным, с которым было интересно говорить, спорить, соглашаться-не соглашаться, но всегда оставаться заинтересованным в новых встречах, разговорах о науке, о нами обоим любимых эндокринологии, эволюции, жизни. Его похвала и оценки были особенно значимы, также как критика всегда приводила к положительным результатам. Мне лично доставило большое удовольствие, когда Николай Николаевич с улыбкой сообщил мне, что цитирует на лекциях студентам две мои строчки: “от жизни жизнь – другого не дано, и вертит ДНК своё веретено”. Как-то раз, на некоем большом семинаре, когда надо было выбирать представителей из нашего коллектива, сотрудник института д.б.н. В.А. Мордвинов, предлагая кандидатуру Н.Н. Дыгало, привел несколько аргументов, из которых самым неотразимым для меня прозвучал такой: “...и, вообще, у Николая Дыгало есть ХАРИЗМА!”. Я не выдержал и спросил: “Что это такое – харизма?”, на что получил совершенно точный ответ – “...ну вы же сами видите!”. И, действительно, что спрашивать – ясный и зоркий взгляд, немного ироничная улыбка, заразительный смех, быстрая реакция и четкая акцентированная речь – не оставляли равнодушными никого из собеседников Николая Николаевича. У меня такое ощущение, что Николай Дыгало не покинул наш институт, во всяком случае, его идеи, его планы, его работа, его манера общения остаются с нами и в нас.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сборник тезисов конференции “Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса”. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1988. 218 с.
2. Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса // Новосибирск: Наука, 1990. 230 с.
3. *Dygalov N.N.* // Acta Naturae. 2023. V. 15. P. 4–13.
4. *Shishkina G.T., Dygalov N.N.* // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2017. V. 7. P. 128–133.
5. *Dygalov N.N.* // Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. 2010. V. 96. P. 675–685. (In Russian)

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МОЗГА К ИНСУЛИНУ ПРИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ

© 2024 г. И. И. Зорина¹, *, А. О. Шпаков¹

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

*E-mail: zorina.inna.spb@gmail.com

Поступила в редакцию 26.06.2024 г.

После доработки 09.07.2024 г.

Принята к публикации 10.07.2024 г.

В настоящее время термин “инсулиновая резистентность” (ИР) расширился и включает не только периферическую, но и центральную ИР. Однако лежащие в ее основе механизмы и физиологические проявления в ЦНС отличаются от таковых на периферии, и в настоящее время концепция центральной ИР претерпела значительные изменения. Имеются многочисленные доказательства развития ослабленного ответа нервной ткани на инсулин, что прямо или косвенно опосредует этиологию и патогенез множества неврологических нарушений. Расшифрованы некоторые молекулярные механизмы, лежащие в основе снижения чувствительности нейронов и глиальных клеток к инсулину, поступающему из кровотока в ЦНС. Настоящий обзор посвящен анализу механизмов возникновения ИР мозга при психических расстройствах, ишемических и травматических повреждениях мозга, наркозе и послеоперационном стрессе, а также при когнитивном дефиците, в том числе, ассоциированном с болезнью Альцгеймера. Также обсуждаются подходы к диагностике и лечению патологических состояний мозга, вызванных центральной ИР.

Ключевые слова: центральная инсулиновая резистентность, сахарный диабет, неврологические нарушения, интраназально вводимый инсулин

DOI: 10.31857/S1027813324030011, EDN: EQXSIY

Список сокращений:

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1
INSR – рецептор инсулина
IRS – белки-субстраты рецептора инсулина
JNK1 – c-Jun N-концевая киназа-1
МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа
PTP1B – протеинфосфотирозинфосфатаза 1B
БА – болезнь Альцгеймера
ИВИ – интраназально вводимый инсулин
МРС – магнитно-резонансная спектроскопия
МЭГ – магнитоэнцефалография
ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография
СД – сахарный диабет
фМРТ – функциональная магнитно-резонансная томография

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение активности гормональных сигнальных систем в мозге может иметь много причин, среди которых снижение уровня гормонов и нейромедиаторов, нарушение их транспорта и сигналинга в клетках нервной системы, изменение экспрессии и активности белков, ответственных за функционирование сигнальных систем мозга. Возникающие в одном сигнальном каскаде нарушения через какое-то время охватывают всю интегративную сеть сигнальных систем мозга. Это приводит к изменениям центральной регуляции периферических функций, эндокринного и гормонального статуса на периферии, результатом чего является развитие множественных патологических процессов в мозге и на периферии. Это усугубляет первоначально возникшие нарушения в отдельном сигнальном каскаде в ЦНС, делая их более выраженными и необратимыми [1, 2]. Все вышесказанное в полной мере относится к инсулиновой системе мозга, ослабление активности

которой характеризуют как центральную инсулиновую резистентность (ИР).

Основы концепции феномена ИР были заложены более 80 лет назад [3]. В дальнейшем были выявлены причины, вызывающие снижение ответа тканей на действие инсулина, среди которых снижение активности инсулина в мозге, уменьшение числа функционально активных инсулиновых рецепторов (INSR) в нейронах и глиальных клетках, нарушение работы пострецепторного аппарата инсулиновой системы, ухудшение связывания INSR с гормоном, снижение транспорта инсулина через ГЭБ. Перечень патологий, при которых возникает центральная ИР, расширился и включает не только ожирение и сахарный диабет (СД), но также различные неврологические и психические заболевания, включая травматические и ишемические повреждения мозга, нейродегенеративные заболевания, депрессию, шизофрению [4].

Основным источником инсулина во взрослом организме у человека и других млекопитающих являются β -клетки поджелудочной железы. Секрция инсулина происходит не только в ответ на поступление пищи, но и подвержена циркадным ритмам [5]. Поступающий в кровоток инсулин транспортируется во все ткани организма, в том числе в ЦНС, куда он проникает посредством высокоспециализированной транспортной системы через ГЭБ. Практически все ткани и типы клеток содержат компоненты инсулиновой системы. Так в мозге INSR экспрессируются в нейронах и других типах клеток [6]. В инсулин-чувствительных тканях (печень, мышцы, жировая ткань) инсулин выступает в качестве анаболического гормона и регулирует обмен глюкозы, липидов и белков, как напрямую, воздействуя на INSR в этих тканях, так и опосредованно через гипоталамические структуры, отвечающие за пищевое поведение и метаболизм [7, 8]. Широко изучаются и другие центральные эффекты инсулина – нейротрофические, нейромодуляторные, нейропротекторные. Регуляция функциональной активности нервных и глиальных клеток напрямую зависит от инсулина, и, как следствие, снижение их чувствительности к инсулину является первопричиной многих эндокринных и неврологических расстройств [4, 8, 9].

Среди молекулярных механизмов, лежащих в основе развития ИР мозга, выделяют окислительный стресс (ОС), липотоксичность и нейровоспаление [10–12]. Эти патологические процессы приводят к снижению связывания инсулина и его функционального гомолога инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) с INSR и родственными им рецепторами IGF-1, к усилению активности негативных регуляторов инсулинового сигналинга (тирозинные фосфатазы), к повышению активности инсулин-деградирующего фермента, что снижает уровень инсулина в мозге [13]. Результатом

является нарушение взаимодействия инсулиновой системы с лептиновой, меланокортиновой, дофаминовой и другими системами мозга, что приводит к дисбалансу во всей интегративной сети сигнальных систем в ЦНС. Центральная ИР чаще всего развивается длительно, но сейчас отсутствуют надежные прямые методы ее лабораторной диагностики. Тем не менее, некоторые имеющиеся подходы для коррекции периферической ИР могут быть применимы и для снижения ИР мозга. В обзоре подробно рассмотрены эффекты инсулина в ЦНС, свидетельства развития ИР мозга при некоторых неврологических нарушениях и терапевтические подходы для ее коррекции.

ИНСУЛИН В ЦНС (СИГНАЛИНГ, ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ)

Ранее считали, что инсулин воздействует на периферические ткани и почти не влияет на ЦНС. Но в дальнейшем было доказано, что инсулин в мозге имеет определяющее значение для нормального функционирования организма и играет важную роль в регуляции фундаментальных клеточных процессов в нейронах, а через центральные механизмы контролирует метаболические и ростовые процессы на периферии [6, 14].

Транспорт инсулина в мозг осуществляется как с участием INSR с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза [15], так и путем пассивного проникновения через фенестрированные капилляры и эпендимные клетки срединного возвышения гипоталамуса или посредством транспорта из спинномозговой жидкости с участием таницитов [16]. При повышении уровня инсулина на периферии сначала наблюдается увеличение его концентрации в мозге, а затем в спинномозговой жидкости [17]. Инсулинотранспортная система в различных отделах мозга функционирует различным образом. В гипоталамусе, продолговатом мозге, варолиевом мосту концентрация инсулина может достигать высоких значений, в то время как в затылочной коре и таламусе она низка. Это, по-видимому, обусловлено различной ролью инсулина в регуляции этих отделов мозга и различной проницаемостью ГЭБ для гормона [17]. Изменение транспорта инсулина через ГЭБ отмечено при различных физиологических и патологических состояниях – в условиях голодания, переедания, а также при ожирении, старении, у пациентов с СД 2 типа и болезнью Альцгеймера (БА), для которых характерна центральная ИР [18–21].

Имеются данные о синтезе инсулина в мозге [22], о чем свидетельствует обнаружение мРНК для инсулина в гипоталамусе, гиппокампе, а также при культивировании нейронов *in vitro*. мРНК инсулина обнаруживается в ЦНС эмбрионов грызунов и других новорожденных животных, а также

в ранний постнатальный период, задолго до начала его синтеза поджелудочной железой, и это связывают с эволюционно детерминированной ролью инсулина в регуляции нейрогенеза и нейродифференцировки. Существуют данные о синтезе инсулина и С-пептида проинсулина в нервной ткани взрослых млекопитающих и человека, где он действует как аутокринный или паракринный регулятор, оказывая влияние на нейротрофические процессы и когнитивные функции и регулируя пищевое поведение и энергетический обмен [22].

Инсулиновый сигнальный путь является одним из наиболее эволюционно древних [23]. Инсулин, связываясь с INSR или гетерокомплексами INSR и рецептора IGF-1, активирует множество сигнальных путей, общих для клеток нервной ткани и инсулин-чувствительных органов на периферии. Ключевым событием является активация 3-фосфоинозитидного пути и ее эффекторного звена – серин/треониновой АКТ-киназы. Компоненты инсулиновой системы присутствуют во всех типах клеток нервной ткани [6]. На рис. 1 представлены основные сигнальные пути, активируемые инсулином, и его центральные и периферические эффекты.

Существуют различия в компонентах инсулиновой сигнальной системы в ЦНС и на периферии. Для ЦНС характерно присутствие INSR А типа, который характеризуется более низкой скоростью десенситизации, что повышает устойчивость мозга к развитию ИР, и с этим, по-видимому, связано наличие множества нейроспецифических функций у инсулина мозга [7].

Активация тирозинкиназного домена INSR приводит к его аутофосфорилированию. Фосфорилированная по остатку тирозина β -субъединица INSR специфично взаимодействует с белками, субстратами INSR (IRS-белками), тирозинное фосфорилирование которых является триггером для активации множества регуляторных и адаптерных белков, содержащих фосфотирозинсвязывающие участки. Это приводит к запуску внутриклеточных каскадов и опосредует регуляцию транскрипции зависимых от инсулина генов [24]. Описано 6 изоформ IRS-белков, ключевую роль из которых играют IRS-1 и IRS-2, обнаруживаемые во всех типах клеток и тканей. IRS-2 в большей мере ответственен за центральные эффекты инсулина, тогда как на периферии основную роль играет IRS-1. Активация IRS-2 связана с активацией роста и дифференцировкой нервных клеток, регуляцией пищевого поведения, когнитивных функций, а также контролем обмена глюкозы, липидов и белков [24]. Как отмечалось выше, тирозинное фосфорилирование IRS-1 и IRS-2 приводит к активации эффекторных белков, содержащих SH2-домены, обеспечивающие их связывание с фосфотирозинсодержащими сайтами

IRS-белков, ключевым среди них является фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) [24]. Результатом активации SH2-доменосодержащих белков является запуск нижележащих сигнальных каскадов, которые ответственны за регуляцию зависимых от инсулина транскрипционных факторов, вовлеченных в контроль роста, дифференцировки, апоптоза и других клеточных процессов.

Основной мишенью IRS-белков являются гетеродимерные изоформы PI3K, катализирующие синтез фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата [25]. Его образование индуцирует транслокацию 3-фосфатидилинозитол-зависимых протеинкиназ 1 и 2 типов (PDK1/2), белка SIN1, компонента комплекса mTORC2 и АКТ-киназы к плазматической мембране [25]. Активация АКТ является одним из ключевых событий в трансдукции инсулинового сигнала. Этот фермент представлен тремя изоформами: АКТ1, АКТ2 и АКТ3, экспрессия которых в ЦНС зависит от области мозга и специфична для определенного типа нейронов и глиальных клеток. АКТ1 и АКТ3 представлены в основном в гиппокампе, АКТ2 – в астроцитах [26]. АКТ играет важную роль в контроле жизнедеятельности клеток, участвуя в регуляции экспрессии генов, ответственных за рост и метаболические процессы, клеточную выживаемость, ангиогенез, дифференцировку. Одним из ключевых инсулин-опосредуемых эффектов АКТ является транслокация в плазматическую мембрану транспортера глюкозы GLUT4, что обеспечивает захват глюкозы клетками [27]. Большая часть глюкозных транспортеров в ЦНС представлена нечувствительными к инсулину формами – GLUT1, GLUT2 и GLUT3 [27]. GLUT2, выявляемый в основном в аркуатных и паравентрикулярных ядрах и в латеральной области гипоталамуса, локализован совместно с глюкокиназой и рецептором 1 типа сульфонилмочевины SUR1, которые выполняют функции сенсоров глюкозы. Транспортер GLUT4 экспрессируется в ЦНС грызунов, но на сравнительно низком уровне. Он идентифицирован в двигательных ядрах спинного мозга, ядрах продолговатого мозга, мозжечке, базальных ганглиях, неокортексе, обонятельной луковице, гипоталамусе, гиппокампе [27]. GLUT4 в основном экспрессируется в нейронах, где он часто колокализован с GLUT3. Предполагают, что GLUT4 в головном мозге участвует в транспорте глюкозы при повышенной в ней потребности нейронов, в инсулинозависимой регуляции активных нейронных цепей и в центральной нервной регуляции гомеостаза глюкозы во всем организме. Повышенная потребность нейронов в энергии удовлетворяется за счет усиления синтеза АТФ. Потребность двигательных нейронов в энергии резко возрастает во время физической нагрузки, тогда как потребность нейронов гиппокампа в энергии возрастает в ответ на интеллектуальные задачи или

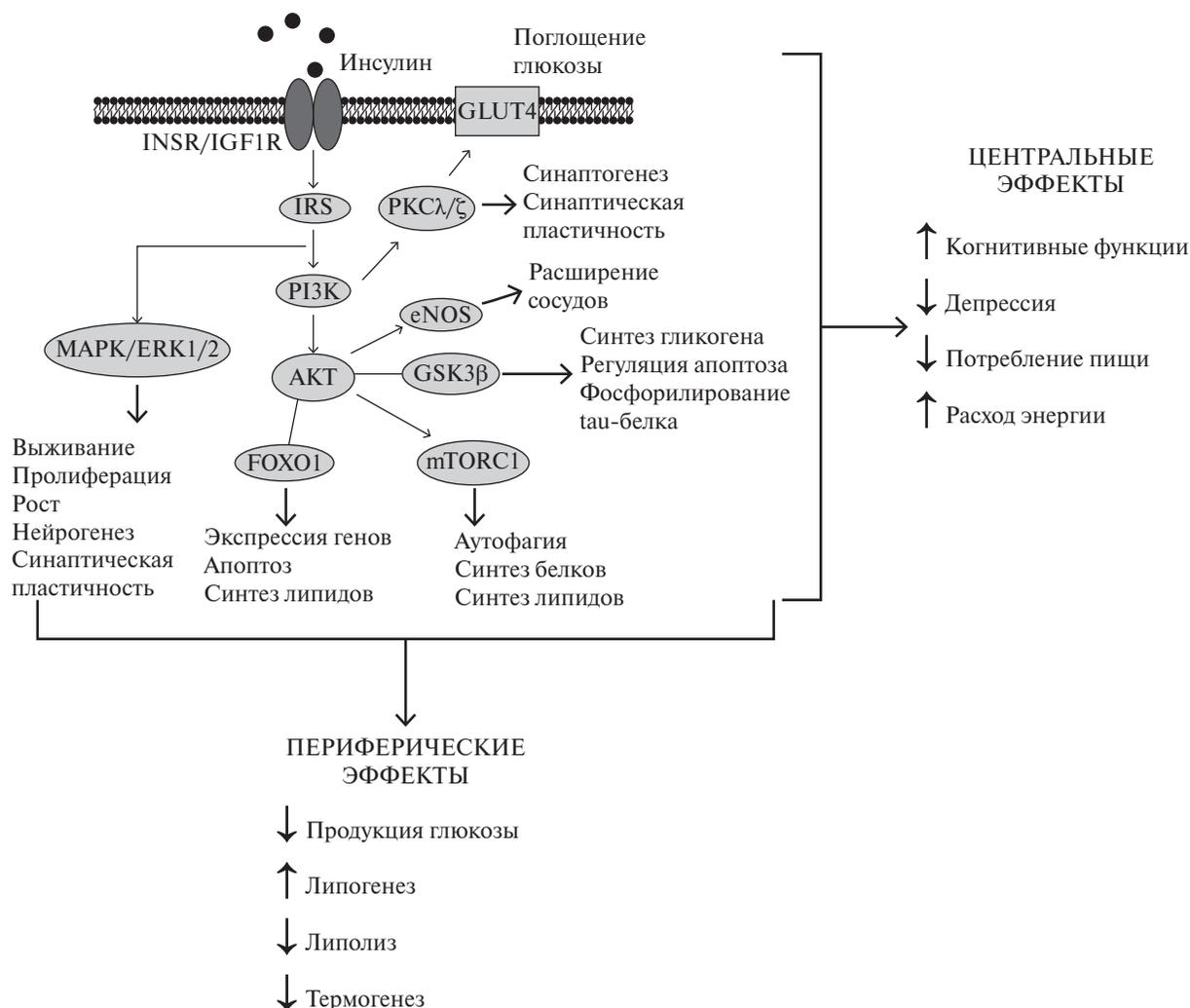


Рис. 1. Общая схема сигнальных путей, активируемых инсулином, и некоторые эффекты инсулина в ЦНС и на периферии.

Сокращения: INSR/IGF1R – рецептор инсулина и IGF-1; IRS – инсулин-рецепторный субстрат; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; AKT – серин/треонин-специфическая протеинкиназа B (AKT); mTORC1 – комплекс мишени рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin complex) 1; GLUT4 – транспортер глюкозы 4-го типа; GSK3β – киназа-3β гликоген синтазы; FOXO1 – транскрипционный фактор FOX (forkhead box) семейства; PKC λ/ζ – протеинкиназа C λ/ζ-типов; eNOS – эндотелиальная изоформа NO-синтазы; MAPK/ERK1/2 – сигнальный путь митоген-активируемый протеинкиназ.

эмоциональный стресс, и эти процессы находятся под контролем инсулина [28]. В нейронах гиппокампа выявлены инсулин-чувствительные транспортеры GLUT8. Они активируются в условиях нарушенного метаболизма глюкозы, при гипергликемии и инсулиновом дефиците, что характерно для СД 1 типа [29].

Другой важной мишенью инсулина является каскад митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), включающий в качестве конечного эффекторного компонента киназы семейства ERK. Путь MAPK/ERK1/2 опосредует регуляцию активности множества транскрипционных факторов и эффекторных

белков [24]. Способность инсулина активировать MAPK/ERK1/2 путь обеспечивает взаимодействие инсулиновой системы с другими путями, включающими другие эффекторные компоненты каскада MAPK.

Имеется несколько механизмов негативной регуляции 3-фосфоинозитидного пути, что, с одной стороны, обеспечивает эффективный контроль реализуемых через него регуляторных эффектов инсулина и, с другой, может стать причиной ИР [30]. IRS-белки содержат сайты для фосфорилирования по остаткам серина и треонина, фосфорилирование которых с-Jun N-концевой киназой-1 (JNK1)

и другими протеинкиназами приводит к ингибированию IRS-белков и выключает их из передачи сигнала, что может приводить к ИР. Еще одним негативным регулятором инсулинового сигнала является протеинфосфотирозинфосфатаза 1В (PTP1B), которая дефосфорилирует INSR и IRS-белки, переводя их в неактивное состояние и препятствуя ответу клетки на инсулин [31]. Функции негативного регулятора 3-фосфоинозитидного пути может выполнять SH2-доменсодержащая инозитол-5'-фосфатаза 2 типа (SHIP2), которая экспрессируется в различных отделах мозга [32]. Повышение ее экспрессии обнаружено при эндокринных нарушениях и при старении, что указывает на ее роль в развитии центральной ИР при метаболических расстройствах и в пожилом возрасте.

Остановимся подробнее на центральных эффектах действия инсулина.

Нейропротекторное действие инсулина. Нейропротекторный эффект инсулина реализуется в основном через каскад PI3K/АКТ/mTOR/p70-S6K-киназа. Следствием его активации является вызываемые инсулином ингибирование нейронального апоптоза, подавление β -амилоидной нейротоксичности и предотвращение накопления β -амилоидных фибрилл, а также снижение ОС и стресса эндоплазматического ретикулума [24]. Активируя 3-фосфоинозитидный путь, инсулин способен снижать аутофагическую гибель клеток, в том числе при патологических процессах, в частности при ишемии головного мозга [33, 34].

Инсулин мозга снижает негативное влияние ОС на нейроны, предотвращая в них митохондриальные дисфункции и восстанавливая окислительно-восстановительный баланс [35]. В условиях ОС в нейронах нарушается процессинг белков, ослабляются сигнальные каскады и нарушается транспорт нейромедиаторов и нутриентов, в том числе глюкозы. Стимулируя захват глюкозы и синтез пирувата, инсулин восстанавливает образование внутриклеточного пула АТФ, и это позволяет снабжать энергией ферменты антиоксидантной защиты и транспортеры [36]. Инсулин также снижает концентрацию внеклеточного глутамата, предотвращая эксайтотоксичность, которая является пусковым механизмом для нейродегенерации [37]. Инсулин подавляет апоптоз путем повышения содержания антиапоптотического белка Bcl-2 и снижения активности каспазы-3 [35].

Нейротрофическое действие инсулина. Инсулин является необходимым ростовым фактором в развивающемся мозге. Еще 40 лет назад было показано, что системное введение инсулина новорожденным крысам повышает интенсивность ростовых процессов в мозге [38]. В дальнейшем было обнаружено, что IRS2 опосредует многие эффекты инсулина на рост и дифференцировку нейронов, на разрастание, созревание и регенерацию

аксонов [39, 40]. Через посредство активации пути IRS/PI3K/mTOR в нейронах инсулин повышает экспрессию белка PSD-95, ответственного за синаптогенез и структурную реорганизацию нейронов [41]. Другим механизмом, через который инсулин реализует свое влияние на рост нейритов и формирование синапсов, является стимуляция экспрессии Tau-белка, который тесно ассоциирован с микротрубочками нейрональных клеток и вовлечен в процессы роста нейритов [42].

Нейромодуляторное действие инсулина. Способность инсулина взаимодействовать с большим числом нейромедиаторных систем мозга и влиять на их активность лежит в основе его нейромодуляторного действия. Показаны регуляторные эффекты инсулина на функциональную активность множества нейромедиаторных систем [43]: глутаматергические NMDA и AMPA-рецепторы [44], ионотропные GABA-рецепторы [6, 45], рецепторы катехоламинов и других биогенных аминов [46, 47]. Инсулин через посредство активации 3-фосфоинозитидного пути контролирует высвобождение нейрорепептидов и моноаминов, влияет на их транспорт и обратный захват в синаптической щели, регулирует функциональную активность рецепторов, специфичных для различных классов нейромедиаторов, контролирует активность ионных каналов [41].

Инсулин играет важную роль в регуляции расхода энергии, а также в контроле пищевого поведения и системы вознаграждения [7, 12]. Показана высокая плотность INSR в гиппокампе, гипоталамусе и мозжечке [24]. Инсулин стимулирует гипоталамическую анорексигенную сигнализацию, которая снижает поисковое поведение, в то время как ингибирование эффектов инсулина способствует анорексигенным эффектам, способствуя увеличению массы тела и усилению потребления пищи [21]. В мозжечке инсулин стимулирует GABA-ергическую ингибирующую активность, которая, как полагают, также участвует в регуляции пищевого поведения [48]. В связи с этим, ИР в центральных регуляторных отделах мозга приводит к ожирению и развитию депрессии, связанной с нарушениями системы вознаграждения. Следует отметить, что гиппокамп и мозжечок являются основными структурами мозга, где нарушается передача сигналов инсулина при БА, что указывает на потенциальную связь между центральной ИР, нейродегенерацией и когнитивным дефицитом [49].

Все вышесказанное свидетельствует о том, что инсулиновая система занимает одно из центральных мест в интегративной сети сигнальных систем мозга и играет исключительно важную роль в контроле нейрогенеза, синаптической пластичности, выживаемости нейронов. Вследствие этого нарушения в инсулиновой системе мозга самым неблагоприятным образом сказываются на

функционировании всей ЦНС и нарушают центральную регуляцию биохимических и физиологических процессов на периферии.

ЦЕНТРАЛЬНАЯ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КАК ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ

Широко обсуждается эволюционное значение возникновения феномена центральной ИР, поскольку ИР мозга описана при естественных физиологических процессах [50]. Сформулирована теория, согласно которой ИР мозга представляет собой транзиторное состояние, которое возникло в ходе эволюции как физиологическая адаптация мозга для поддержания нормогликемии при воздействии экстремальных физических нагрузок, холода [51], инфекций [52, 53], при ограничении пищевого рациона и при голодании [51]. Так голодание приводит к запуску глюконеогенеза в печени, липолизу в белом и буром жире, усилению термогенеза, что позволяет в наиболее экономном режиме переждать дефицит пищевых ресурсов [51, 54]. Повышение уровня провоспалительных цитокинов при инфекционных заболеваниях на время ослабляет инсулиновую сигнализацию в нервных клетках, что также вносит вклад в развитие ИР. Воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды и инфекционные заболевания не приводят к системной ИР, и это свидетельствует о том, что ИР мозга не обязательно вызывает системную ИР [8]. С наступлением благоприятного периода происходит восстановление чувствительности тканей мозга к инсулину, и это не приводит к нарушению метаболизма. Однако в настоящее время это эволюционное преимущество вносит негативный вклад в развитие ИР мозга и ассоциированных с ней патологий.

ЦЕНТРАЛЬНАЯ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПРИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ – СВИДЕТЕЛЬСТВА И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Нарушение инсулинового сигнального пути в мозге до недавнего времени связывали в основном с СД 1 типа, с характерным для него острым дефицитом инсулина, в том числе в ЦНС. В меньшей степени были изучены нарушения инсулинового сигналинга при СД 2 типа. Было принято считать, что нарушения в инсулиновых каскадах при ожирении и СД 2 типа происходят в основном в периферических тканях, в то время как в ЦНС чувствительность нейронов к инсулину сохраняется или претерпевает небольшие изменения [1, 4, 8, 24].

В дальнейшем было обнаружено, что центральная ИР выявляется как в условиях метаболического синдрома и СД 2 типа, так и при нейродегенеративных заболеваниях, причем по этиологии, молекулярным механизмам и клиническим последствиям она отличается от периферической ИР [9]. Более того БА часто рассматривают как СД 3 типа. У пациентов с поздними стадиями БА отмечают выраженные признаки нарушений инсулинового сигналинга в ЦНС, в большинстве случаев не связанные или слабо связанные с изменениями периферического метаболизма, характерными для СД 2 типа. На протяжении длительного времени центральная ИР, более характерная для СД 3 типа, и периферическая ИР, типичная для СД 2 типа, могут развиваться и существовать независимо друг от друга [9, 49]. В то же время снижение инсулиновой чувствительности в мозге быстро приводит к нарушению центральной регуляции периферического метаболизма и вызывает дисфункцию панкреатических β -клеток, результатом чего могут стать СД 2 типа и метаболический синдром. Другими словами, СД 2 типа является фактором риска для развития СД 3 типа (БА), и наоборот [1].

Важную роль в развитии ИР в мозге играют нарушения в инсулиновых сигнальных каскадах, вызванные изменениями активности INSR, IRS-белков и компонентов 3-фосфоинозитидного пути [2, 25, 26]. Создание и изучение линии мышей, нокаутных по INSR А-типа в нейрональных клетках (NIRKO), пролило свет на центральные механизмы функционирования инсулинового пути. У этих грызунов наблюдается гиперфагия и развивается зависимое от диеты предиабетическое состояние, для которого характерны повышенные массы тела, системная ИР, слабо выраженная гипергликемия, повышение концентрации инсулина, лептина и триглицеридов в крови [55, 56]. NIRKO-мыши демонстрируют тревожное поведение с изменением обмена дофамина, что свидетельствует об участии инсулинового сигналинга в регуляции дофаминергических нейронов [57]. У мышей, нокаутных по рецептору IGF-1 в гиппокампе и амигдале, повышается тревожность, нарушается системный гомеостаз глюкозы, а нокаут обоих рецепторов (INSR, рецептор IGF-1) в гиппокампе приводит к нарушению пространственной памяти [58]. Нарушение пространственной памяти и долговременной потенциации отмечено и при внедрении в гиппокамп лентивирусной конструкции, экспрессирующей антисмысловую последовательность, которая снижает экспрессию INSR, что свидетельствует о развитии ИР гиппокампа при дефиците INSR [59].

Ослабление активности инсулинового пути способствует нейродегенерации. В мозге NIRKO-мышей нарушена активность PI3K, и это приводит к снижению фосфорилирования АКТ-киназы,

результатом чего является усиление гиперфосфорилирования ассоциированного с микротрубочками Тау-белка, ответственного за развитие нейродегенерации, в том числе при БА [56, 60]. Другим свидетельством вклада ослабления инсулинового сигналинга в развитие нейродегенерации является то, что в гиппокампе *irs2*-дефицитных мышей повышалась плотность нейрофибрилярных клубков, содержащих гиперфосфорилированный Тау-белок [39]. Имеются клинические данные о снижении экспрессии и фосфорилирования INSR и ослаблении инсулиновых каскадов в мозге пациентов с СД 2 типа и БА [21, 26, 40]. Снижение экспрессии и активности IRS-белков, в том числе IRS-1, обнаружено у пациентов с БА, что приводит к ослаблению PI3K-каскада и нарушению экспрессии генов, ответственных за нейрогенез, нейропротекцию и нейродифференцировку [61].

В пользу взаимосвязи между нарушениями в PI3K-пути и центральной ИР свидетельствуют данные, полученные при изучении мелатониновой сигнализации в мозге. Регуляция мелатонином углеводного гомеостаза включает его связывание с мелатониновыми рецепторами супрахиазматического ядра гипоталамуса, регулирующего циркадные ритмы, ведущее к активации IRS-1 и нижележащих компонентов 3-фосфоинозитидного пути [62]. Подавление мелатонинового сигналинга с помощью антагонистов мелатониновых рецепторов и интрацеребральное введение ингибитора PI3K ослабляло ингибирующее влияние мелатонина на глюконеогенез в печени, следствием чего было усиление ИР мозга и ИР на периферии [63]. Снижение уровня мелатонина отмечено у пациентов с предиабетическими состояниями, метаболическим синдромом и СД 2 типа [64]. Эти данные указывают на тесную взаимосвязь между нарушениями циркадного ритма и развитием центральной ИР, в основе чего лежит ослабление мелатониновых путей в гипоталамусе, регулирующих активность PI3K и зависимых от нее транскрипционных факторов, контролируемых инсулином мозга [64].

Важную роль в развитии ИР в ЦНС играет усиление провоспалительных процессов в мозге, являющееся следствием ОС, гиперинсулинемии, гипергликемии, дислипидемии, аутоиммунных процессов, инфекционных заболеваний, ишемических и травматических повреждений [10, 11, 37]. Ряд авторов рассматривают нейровоспаление, как основную причину центральной ИР и возникающих вследствие этого нейрональных дисфункций [65, 66]. Увеличение уровня провоспалительных цитокинов изменяет синаптическую пластичность нейронов гиппокампа и нарушает пространственную память и обучение [66]. Провоспалительные цитокины запускают сигнальные каскады, подавляющие активность инсулиновой системы. Это обусловлено активацией ими JNK-киназ, которые

фосфорилируют IRS-белки по ингибирующим сайтам [67]. Наряду с цитокинами, JNK-киназы могут активироваться свободными жирными кислотами и факторами стресса эндоплазматического ретикулума [65].

Другим механизмом влияния провоспалительных цитокинов на инсулиновую чувствительность является активация ими негативных регуляторов инсулинового сигналинга – белков SOCS-семейства, которые дефосфорилируют IRS-1 и IRS-2 и вызывают их деградацию в протеосомах [24, 30]. Определенный вклад в развитие центральной ИР вносит индуцибельная изоформа NO-синтазы (iNOS), активируемая провоспалительными цитокинами и бактериальными липополисахаридами [68, 69]. iNOS опосредует S-нитрозилирование сигнальных молекул, в частности INSR и АКТ в гипоталамусе, и тем самым ослабляет проведение сигнала инсулина и способствует развитию ожирения [69]. Нокаут гена, кодирующего iNOS, предотвращает развитие ИР [68]. Таким образом, активация белков SOCS-семейства и iNOS может вносить существенный вклад в центральную ИР, индуцируемую провоспалительными факторами.

Активные формы кислорода, при избытке которых развивается ОС, в норме участвуют в регуляции активности большого числа сигнальных путей, в том числе инсулиновых [70]. Мозг особенно чувствителен к окислительному повреждению из-за высокой скорости утилизации нервными клетками кислорода и относительно низкой антиоксидантной активности по сравнению с другими тканями, поэтому ОС пагубно сказывается на функциональном состоянии нервной ткани [71]. ОС сопровождается множеством заболеваний, поскольку его возникновение связано с изменением фундаментальных клеточных процессов, и вносит вклад в развитие ИР мозга. В ряде работ показана индукция церебральной ИР при усилении ОС и изменении экспрессии генов и активности антиоксидантов, а также при повышении уровня продуктов окисления белков, липидов и ДНК [71, 72]. Нарушение работы митохондрий в гипоталамусе путем нокаута гена шаперона Hsp60 достаточно, чтобы вызвать дисфункцию митохондрий, усиление окислительного стресса и центральную ИР [73].

В настоящее время центральная ИР показана как при эндокринных нарушениях и БА, так и при различных неврологических патологиях и процессах, и этот список продолжает увеличиваться. В таблице 1 суммированы механизмы, лежащие в основе возникновения центральной ИР, при некоторых неврологических заболеваниях и психических расстройствах.

Неврологические нарушения (биполярные расстройства, депрессия, шизофрения). Нарушение передачи инсулинового сигнала вовлечено в патофизиологию биполярных расстройств (БР) [74, 75].

Табл. 1. Основные механизмы возникновения центральной инсулиновой резистентности при психических и неврологических расстройствах

Патология	Основные механизмы
Психические расстройства (депрессия, биполярные расстройства, шизофрения)	Патологическое состояние сигнальной сети мозга, нарушение метаболизма, развитие инсулинорезистентности мозга.
Наркоз и послеоперационный период	Угнетение работы мозга, гипергликемия при индукции наркоза, острое воспаление, окислительный стресс, центральная инсулинорезистентность как физиологическая адаптация к голоданию.
Травматические и ишемические повреждения мозга	Нейровоспаление, митохондриальная дисфункция, окислительный стресс.
Когнитивный дефицит и болезнь Альцгеймера	Дисфункция функциональной активности IRS-1 вследствие β -амилоид-зависимого нейровоспаления. Наличие метаболических нарушений, увеличивающее риск возникновения инсулинорезистентности.

Кроме того, метаболические нарушения, СД 2 типа и ожирение, широко распространены при БР, а у лиц с БР вероятность развития СД 2 типа в два раза выше [74]. Применение интраназально вводимого инсулина (ИВИ) и сенсбилизаторов инсулинового сигналинга, пиоглитазона и лираглутида, при лечении БР, привело к различным результатам [76-78]. Так ИВИ улучшал когнитивные функции у пациентов с БР [76], в то время как пиоглитазон при биполярной депрессии продемонстрировал недостаточную активность в качестве антидепрессанта [78]. Следует, однако, отметить, что существенным ограничением этого направления исследований является измерение только периферической, а не центральной чувствительности к инсулину, тогда как по имеющимся данным между ними нельзя ставить знак равенства.

Инсулин модулирует дофаминергические мезолимбические пути, отвечающие за мотивацию и вознаграждение. Нарушение этого механизма снижает эффективность дофаминовой сигнальной трансдукции, обмен и обратный захват дофамина [79]. В дофаминергических нейронах вентрального стриатума ослабление инсулинового сигналинга было ассоциировано с симптомами депрессии, в то время как ИР в амигдале вызывает повышенное стремление к вознаграждению [80, 81]. Наличие ИР мозга у людей с диагностированной депрессией приводит к более высокому уровню ангедонии, что проявляется в активации поискового поведения и в увеличении количества потребляемой пищи, в отличие от пациентов с депрессией, но без ИР мозга [82].

При шизофрении, как и при БР, и депрессии, часто наблюдается симптомокомплекс, характерный для метаболических нарушений. Хотя обычно это связывают с побочными эффектами

психотических препаратов, но нарушения периферического метаболизма у первично диагностированных лиц, не принимающих лекарственных препараты, также широко распространены [83]. В патогенез шизофрении вовлечены следующие механизмы: нарушение функций дофаминергической и глутаматергической нейромедиаторных систем [84], системные и центральные провоспалительные процессы [85], нарушение энергетического метаболизма и обмена глюкозы [86]. Ослабление активности инсулиновой системы мозга вследствие центральной ИР может вносить значимый вклад в развитие шизофрении [43]. По данным анализа *post mortem*, у пациентов с шизофренией описано снижение экспрессии INSR и нижележащих компонентов инсулинового сигналинга во фронтальной коре [87, 88]. У лиц с шизофренией снижена визуально-пространственная память, что коррелирует с нарушением потребления глюкозы тканями мозга и появлением маркеров ИР во внеклеточных везикулах нейронального происхождения [89].

Когнитивные расстройства вследствие наркоза. Когнитивные расстройства и послеоперационный делирий являются одними из наиболее распространенных послеоперационных осложнений, и они связаны, как с хирургическим вмешательством, так и с длительным наркозом. Патофизиология этих процессов изучена недостаточно, но считается, что их основными механизмами являются нарушение нейроэндокринной регуляции, нейровоспаление, нарушение связности нейронных сетей, а также ишемическое повреждение, вызванное снижением мозгового кровотока [90]. В литературе описано не только возникновение центральной ИР вследствие индукции наркоза, но и усугубление текущей ИР в послеоперационный период [91]. Известно, что

наркоз приводит к гипергликемии, вследствие чего снижается ответ мозга на инсулин, и это сопровождается ростом уровня провоспалительных цитокинов и нейровоспалением [91].

Появление транзиторной ИР может быть обусловлено длительным голоданием перед операционным вмешательством. Предоперационная углеводная нагрузка становится все более частой хирургической практикой, поскольку может предотвратить состояние ИР, возникающее из-за стресса и голодания [92]. Об участии инсулиновой системы нейронов в патогенезе когнитивных нарушений в послеоперационный период свидетельствуют исследования эффектов ИВИ при длительном наркозе [2]. Положительное действие ИВИ на когнитивные функции показано не только у грызунов [93-96], но и в клинических испытаниях [97]. Механизмы действия ИВИ при длительном наркозе связаны с уменьшением гиперфосфорилирования Тау-белка [93-95], восстановлением экспрессии нейротрофического фактора мозга BDNF и ряда других синаптических белков [95, 96], а также с противовоспалительным эффектом ИВИ [97].

Травматические и ишемические повреждения ЦНС. Травмы мозга и церебральная ишемия, различающиеся по этиологии, имеют сходный патогенез и приводят к когнитивному дефициту [98]. Нейровоспаление, митохондриальная дисфункция и ОС в этом случае приводят к развитию ИР мозга, однако, эти процессы еще требуют дальнейшего исследования.

Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и симпатической вегетативной нервной системы вследствие травмы головного мозга является причиной гипергликемии. Это обусловлено тем, что повышение продукции кортикостероидов, катехоламинов и глюкагона способствует увеличению выработки глюкозы и снижению секреции инсулина поджелудочной железой [99–101]. У животных с экспериментальной травмой мозга было обнаружено снижение чувствительности мозга к инсулину, что может быть следствием эксайтотоксичности глутамата, вызванной травматическим воздействием и активацией провоспалительных процессов в головном мозге [100, 102, 103]. При однократном травматическом воздействии снижение чувствительности мозга к инсулину наблюдается в течение 7 дней, а при повторной травме – в сроки до 28 дней [102, 104]. Даже через 4 месяца после травматического воздействия поглощение глюкозы в зонах мозга, ответственных за когнитивные функции, снижается, что указывает на отставленные эффекты травмы головного мозга на глюкозный гомеостаз в ЦНС [105]. При этом наблюдается региональная специфичность развития ИР при травматических повреждениях мозга, о чем свидетельствует разная степень снижения

поглощения глюкозы в стриатуме и в гиппокампе, которая положительно коррелирует с ухудшением пространственной памяти [105]. Сопутствующие эндокринные патологии, а также системная и центральная ИР ухудшают последствия травмы головного мозга и снижают восстановительный потенциал нервной ткани. Повреждение мозга у мышей с ожирением сопровождается ослаблением стимулирующего воздействия инсулина на АКТ-зависимый путь, выраженным нейровоспалением, значительным ухудшением способности к обучению, резким ухудшением памяти и тяжелым тревожно-депрессивным состоянием [102].

В контексте исследования ишемического повреждения мозга основное внимание исследователей сосредоточено на изучении влияния периферической ИР, имеющейся у пациента в момент инсульта, поскольку она является фактором риска инсульта. Наличие ИР повышает риск повторного инсульта, ухудшает его исход и увеличивает смертность [106]. По данным множества клинических исследований сделаны следующие выводы. ИР тесно связана с возникновением ишемического инсульта, коррелирует с ранним ухудшением неврологического статуса у пациентов, перенесших инсульт, постинсультной депрессией и заболеванием мелких сосудов головного мозга [106].

Клинические исследования центральной ИР при инсульте отсутствуют. Однако результаты экспериментальных исследований показывают, что ухудшение передачи инсулинового сигнала и снижение активации АКТ-киназы вследствие ИР ухудшает исход инсульта, не позволяя реализовать нейропротекторный механизм АКТ-зависимого пути. У мышей с нейрон-специфичным нокаутом INSR отмечено снижение активации АКТ и повышение фосфорилирования Тау-белка, что, тем не менее, не приводит к дефициту памяти и образованию амилоидных бляшек [39]. В то же время при диета-индуцированной ИР у мышей обнаруживается корреляция между ослаблением АКТ-сигналинга и увеличением образования амилоидных бляшек, что сопровождается ухудшением пространственной памяти [107]. У диабетических мышей BKS-db/db и у ob/ob мышей, генетически предрасположенных к ожирению, продемонстрировано увеличение зоны инфаркта и повышение когнитивного дефицита по сравнению с недиабетическими животными, и это связывают с центральной ИР [108].

По данным экспериментов на клеточных культурах при моделировании ИР в нейронах коры головного мозга, длительное воздействие инсулина усиливает активацию АКТ-киназы, но значительно ослабляет ответ клеток на последующую кратковременную обработку инсулином, что приводит к снижению нейропротекторного эффекта гормона. Тем самым, центральная ИР усугубляет

ишемическое повреждение головного мозга, ослабляя фосфорилирование АКТ-киназы [109].

Одним из следствий ИР является ухудшение работы микрососудистого русла и повышение вероятности тромбоза [110]. Наличие ИР в эндотелиоцитах препятствует реализации инсулин-зависимой активации NO-синтазы и ухудшает вазодилатацию сосудов. Более того, в этих клетках показана активация MAPK-сигнального пути и повышение вследствие этого продукции эндотелина-1, мощного вазоконстриктора, что ухудшает способность к увеличению мозгового кровотока при возникающей ишемии головного мозга [110].

Ослабление инсулиновой сигнализации при церебральной ишемии может возникать вследствие развития митохондриальной дисфункции, ОС и нейровоспаления [111]. И эти факторы могут как усиливать предшествующую инсульту ИР мозга, так и заложить основы для развития ИР нервной ткани *de novo*.

СИМПТОМЫ ИР МОЗГА, ДИАГНОСТИКА И ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ

Для описания симптомов ИР мозга можно обратиться к данным пациентов с СД 2 типа, БА и данным экспериментов на животных с нейрон-специфичным нокаутом гена *INSR*. Среди симптомов можно выделить нарушение баланса пищевого поведения в сторону переедания, нестабильный эмоциональный фон, депрессивное состояние, ухудшение когнитивных функций, в том числе пространственной памяти, нарушение терморегуляции [2, 4, 9, 40].

На данный момент не существует прямых лабораторных методов диагностики центральной ИР, а также не определены диагностические маркеры для ее характеристики. В экспериментах используют широкий спектр диагностических подходов от физических методов до биохимических, например, исследование уровней глюкозы и инсулина в крови в ответ на ИВИ, потребление пищи,

Табл. 2. Современные подходы для фармакологической коррекции центральной инсулиновой резистентности при эндокринных и неврологических расстройствах

Подход/механизм	Препарат	Применение
Восстановление уровня инсулина в ЦНС	Интраназально вводимый инсулин	Доклинические и клинические испытания
	Аналоги инсулина быстрого действия	Применяются
Применение ингибиторов инсулиндеградирующего фермента	Низкомолекулярные агенты	Доклинические испытания
Ингибирование работы негативных регуляторов сигналинга инсулина	Ингибиторы РТР1В-фосфатазы (тродусквемин, кларамин)	Клинические испытания
Регуляция работы периферической нервной системы (вероятный механизм)	Ингибиторы натрий-зависимого переносчика глюкозы 2 типа (эмпаглифлозин, дапаглифлозин)	Применяются
Повышение чувствительности к эндогенному инсулину, модуляция работы инсулиновой сигнальной системы	Метформин	Применяется
	Производные тиазолидиндионов	Применяются
	Бромкриптин	Применяется
	Мелатонин	Клинические испытания
	Аналоги глюкагоноподобного пептида-1, ингибиторы дипептидил пептидазы-4	Применяются
	Аналоги амилина (прамлинтид)	Применяются
	Аналоги лептина (метрелептин)	Применяются
Иммуносупрессивная терапия	Инфликсимаб, адалимумаб	Клинические испытания

оценка содержания инсулина в СМЖ [14, 112]. Интенсивно разрабатываются тест-системы для исследования наличия компонентов инсулиновой сигнальной системы в крови на основе внеклеточных экзосом нейронального происхождения.

В исследованиях на людях широко применяются современные методы нейровизуализации, функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ), магнитно-резонансная спектроскопия (МРС), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), магнитоэнцефалография (МЭГ). Основным методом исследования центральной ИР на данный момент является фМРТ, которая имеет высокую разрешающую способность и позволяет исследовать не только кортикальные структуры, но и подкорковые. С помощью фМРТ описано региональное действие инсулина [113], в том числе на структуры мозга, регулирующие систему вознаграждения, пищевое поведение и когнитивные функции, нарушения которых связывают с развитием центральной ИР [113, 114]. С помощью МЭГ были изучены эффекты инсулина на активность нейронов, исследованы корреляции между действием инсулина и массой тела, метаболическими и генетическими факторами и развитием ИР в ЦНС [115, 116]. ПЭТ используют для оценки потребления мозгом глюкозы при действии инсулина [117], поскольку наличие центральной ИР снижает потребление глюкозы клетками нервной ткани.

Следует отметить, что концепция центральной ИР и ее вовлеченности в патогенез эндокринных и неврологических нарушений пересматривается, и на данный момент нарабатывается экспериментальная и клиническая база для коррекции ИР мозга и ассоциированных с ней расстройств. В качестве методов коррекции патологического состояния инсулиновой системы в ЦНС могут быть применены подходы, реализуемые для лечения периферической ИР. Среди них выделяют контроль рациона, увеличение физической нагрузки, снижение психоэмоционального стресса и соблюдения режима работы-отдыха, отказ от вредных привычек, а также медикаментозную терапию препаратами с изученным центральным действием.

Основные подходы к медикаментозной терапии объединены в таблице 2 [2, 8, 118]. Среди них можно выделить восстановление уровня инсулина в ЦНС с помощью периферического или центрального введения инсулина или при применении ингибиторов инсулиндеградирующего фермента; ингибирование работы негативных регуляторов сигналинга инсулина; регуляцию работы периферической нервной системы, направленную на повышение чувствительности нисходящих сигналов инсулина из регуляторных отделов мозга; повышение чувствительности INSR к эндогенному инсулину; модуляцию работы инсулиновой сигнальной системы путем изменения функционирования

других нейромедиаторных и нейрогормональных систем (в том числе лептиновой и меланокортиновой систем мозга); иммуносупрессивную терапию для снятия нейровоспаления.

Остановимся более подробно на применении ИВИ при коррекции ИР ЦНС, которое на протяжении вот уже полутора десятков лет интенсивно изучается в нашей лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН [2].

ПРИМЕНЕНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ИР

Сходство патологических механизмов, лежащих в основе острых и хронических повреждений головного мозга, предполагает, что лекарственное средство с комплексным воздействием, предотвращающее развитие этих процессов, может быть эффективным универсальным препаратом для терапии различных поражений мозговой ткани и предотвращения возможных осложнений [2, 119]. В этом отношении применение ИВИ может быть весьма эффективным для восстановления уровня инсулина в ЦНС и чувствительности нервной ткани к инсулину.

За последние десятилетия интраназальный способ введения приобретает особую актуальность для доставки лекарственных веществ в ЦНС. Более 30 лет назад William H. Frey II впервые предложил использование интраназального введения различных веществ, гормонов, белков и ростовых факторов, и в том числе инсулина, для лечения БА и других заболеваний ЦНС [120]. К настоящему моменту описаны и проанализированы более 50 клинических испытаний ИВИ при различных патологиях ЦНС (<https://clinicaltrials.gov/>). Из полученных результатов можно сделать вывод, что применение ИВИ не вызывает опасений в отношении кратких и долгосрочных побочных эффектов [2, 14, 119].

ИВИ обеспечивает неинвазивную прямую доставку инсулина в головной мозг, минуя ГЭБ, что позволяет избежать потенциальных системных побочных эффектов, связанных со снижением уровня глюкозы в крови. После распыления в носовой полости инсулин проникает в ЦНС с помощью внутриклеточного транспорта посредством связывания с INSR и с помощью внеклеточного транспорта с током межклеточной жидкости. Исследования на животных показали, что поступление ИВИ вызывает активацию INSR и повышает фосфорилирование АКТ по активирующим фермент сайтам, причем действие инсулина является специфичным для определенных отделов мозга, что обусловлено различной плотностью распределения в них INSR [121]. Использование ИВИ приводит к быстрому повышению уровня инсулина в СМЖ без заметных изменений периферического

уровня инсулина, и это позволяет предположить, что инсулин при интраназальном введении в основном остается в ЦНС [121].

ИВИ показал обнадеживающие результаты в клинических испытаниях при терапии БА, приводя к снижению ИР, улучшению когнитивных функций у пациентов [14]. Тем не менее, необходимо учитывать, что длительное и интенсивное введение инсулина в головной мозг может вызвать усиление уже существующей ИР в ЦНС и другие побочные эффекты, поэтому необходимо оптимизировать дозы и схему введения гормона.

В клинических испытаниях ИВИ отмечено его положительное действие на контроль массы тела, пищевое поведение, настроение и когнитивные функции не только у здоровых субъектов, но и при СД 2 типа, БА, мягком когнитивном дефиците [14, 121, 122]. Интересным является улучшение различных видов памяти при терапии ИВИ. Одним из возможных механизмов восстановления памяти может быть воздействие инсулина на функциональные взаимосвязи между обоими полушариями, что было показано у пациентов с СД 2 типа [123]. Улучшение мозгового кровотока и повышение потребления глюкозы нервными клетками может быть другим аспектом положительного влияния ИВИ на память и другие когнитивные процессы [14]. Более того, длительное применение ИВИ у здоровых людей оказывает антидепрессантное действие, что проявляется в повышении уверенности в себе, улучшении психоэмоционального состояния и снижении тревожности [47]. Учитывая, что ИВИ оказывает стимулирующее действие на когнитивные процессы и что когнитивные нарушения признаны основными симптомами депрессии, данный фармакологический подход может представлять собой новую стратегию для комбинированного использования с доступными в настоящее время антидепрессантами.

Весьма перспективным является применение ИВИ при церебральной ишемии. Клинические испытания ИВИ при этой патологии отсутствуют, а экспериментальные данные о механизмах действия и эффективности ИВИ при ишемии головного мозга немногочисленны и ограничены в основном нашими работами [34, 124-126]. По имеющимся данным, ИВИ оказывает выраженное нейропротекторное действие при ишемии, обусловленное активацией PI3K/AKT-сигнального пути. Об этом свидетельствует снижение гибели нервных клеток в гиппокампе и коре головного мозга крыс, перенесших церебральную ишемию-реперфузию [34, 127]. Нами показано, что действие ИВИ направлено на снижение ОС и повышение экспрессии ферментов антиоксидантной защиты [125]. Другими авторами установлено повышение потребления глюкозы мозгом у крыс, получавших ежедневно ИВИ, после перенесенной

травмы мозга, что указывает на стимулирующее влияние инсулина на процесс потребления глюкозы в ЦНС, тем более что травматические повреждения также могут сопровождаться центральной ИР [128]. В модели геморрагического инсульта ИВИ снижает метаболический дистресс у мышей, уменьшая соотношение лактат/пируват и повышая уровень глюкозы в спинномозговой жидкости [124], что указывает на нейропротекторный эффект инсулина мозга при инсульте различной этиологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги, необходимо отметить, что функционирование инсулиновой сигнальной системы в мозге и природа центральной ИР еще до конца не изучены, и это обусловлено целым рядом причин. Во-первых, несмотря на общее структурно-функциональное сходство с инсулиновой системой на периферии, инсулиновая система в нейронах имеет ряд значимых отличий, которые состоят не только в иной преобладающей форме INSR, в преобладании IRS2 над IRS1 и в особенностях паттерна нейрональных внутриклеточных эффекторов, но и в существенно отличающейся от периферических тканей архитектуре сигнальных каскадов мозга, которые взаимодействуют между собой и, тем самым, в значительной степени определяют функциональную активность друг друга. Тем самым, причинами ИР мозга могут быть не изменения в собственно инсулиновом сигнальном каскаде, а изменения во взаимодействии его компонентов (как на рецепторном, так и на пострецепторном уровнях) с компонентами других сигнальных систем. Именно этим предопределяется более широкий спектр регуляторных влияний инсулина в мозге в сравнении с периферией. Во-вторых, концентрация инсулина в мозге существенно выше, чем на периферии, а функции инсулина в мозге не менее критичны для жизнедеятельности организма, и это заставляет природу использовать широкий спектр молекулярных механизмов, направленных на предотвращение развития ИР в ЦНС. Эти механизмы в настоящее время не до конца понятны, а попытки экстраполировать на ЦНС более изученные и, в какой-то степени, более простые механизмы развития периферической ИР не всегда релевантны, а в ряде случаев могут быть и ошибочными. В-третьих, до сих пор не понятны причинно-следственные связи между ИР мозга и развитием неврологических и нейродегенеративных заболеваний. Так, например, БА может приводить к развитию метаболического синдрома и диабетической патологии, в то время как при СД 2 типа с высокой частотой развиваются признаки деменции, и в основе этих переходов лежит развитие центральной ИР, но ее причины в каждом случае совершенно разные. Соответственно и терапия связанных с центральной ИР неврологических

расстройств должна существенно отличаться от таковой для метаболических заболеваний, ассоциированных с периферической ИР, и учитывать этиологию и патогенез конкретного неврологического расстройства. Решение всех этих проблем — прерогатива ближайших десятилетий, и несомненно, что дальнейшее изучение инсулиновой системы мозга и центральной ИР являются ключом к их решению.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-75-01083).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M.* // *Future Sci.* OA. 2015. V. 1. № 1(3). P. FSO25.
2. *Shpakov A.O., Zorina I.I., Derkach K.V.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 4. P. 3278.
3. *Lozinski E., Frohlich L.J.* // *Edinb. Med. J.* 1942. V. 49. № 2. P. 137.
4. *Rhea E.M., Banks W.A., Raber J.* // *Biomedicines.* 2022. V. 10. № 7. P. 1582.
5. *Chan K., Wong F.S., Pearson J.A.* // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2022. V. 202213. P. 920261.
6. *Chen W., Cai W., Hoover B., Kahn C.R.* // *Trends Neurosci.* 2022. V. 45. № 5. P. 384–400.
7. *Agrawal R., Reno C.M., Sharma S., Christensen C., Huang Y., Fisher S.J.* // *Am. J. Physiol.-Endoc. M.* 2021. V. 321 № 1. P. E156–E163.
8. *Scherer T., Sakamoto K., Buettner C.* // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2021. V. 17. № 8. P. 468–483.
9. *Hölscher C.* // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2020. V. 29. № 4. P. 333–348.
10. *Bhusal A., Rahman M.H., Suk K.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 79. № 1. P. 32.
11. *Ghowsi M., Qalekhani F., Farzaei M.H., Mahmudii F., Yousofyand N., Joshi T.* // *BioMedicine.* 2021. V. 11. P. 13–22.
12. *Milstein J.L., Ferris H.A.* // *Mol. Metab.* 2021. V. 52. P. 101234.
13. *Pomytkin I., Pinelis V.* // *Life (Basel).* 2021. V. 22. № 11(3). P. 262.
14. *Hallschmid M.* // *J. Neuroendocrinol.* 2021. V. 33. № 4. P. e12934.
15. *Rhea E.M., Banks W.A.* // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 521.
16. *Beddows C.A., Dodd G.T.* // *J. Neuroendocrinol.* 2021. V. 33. P. e12947.
17. *Gray S.M., Barrett E.J.* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018. V. 315. № 2. P. C125–C136.
18. *Kern W., Benedict C., Schultes B., Plohr F., Moser A., Born J., Fehm H.L., Hallschmid M.* // *Diabetologia.* 2006. V. 49. № 11. P. 2790–2792.
19. *Heni M., Schöpfer P., Peter A., Sartorius T., Fritsche A., Synofzik M., Häring H.U., Maetzler W., Hennige A.M.* // *Acta Diabetol.* 2014. V. 51. № 4. P. 679–681.
20. *Sartorius T., Peter A., Heni M., Maetzler W., Fritsche A., Häring H.U., Hennige A.M.* // *PLoS One.* 2015. V. 12. № 10(5). P. e0126804.
21. *Kullmann S., Valenta V., Wagner R., Tschritter O., Machann J., Häring H.U., Preissl H., Fritsche A., Heni M.* // *Nat. Commun.* 2020. V. 15. № 11(1). P. 1841.
22. *Dakic T., Jevdjovic T., Lakic I., Ruzicic A., Jasnica N., Djurasevic S., Djordjevic J., Vujovic P.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 7. P. 6586.
23. *Pertseva M.N., Shpakov A.O.* // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2002. V. 38. P. 547–561.
24. *White M.F., Kahn C.R.* // *Mol. Metab.* 2021. V. 52. P. 101304.
25. *Fruman D.A., Chiu H., Hopkins B.D., Bagrodia S., Cantley L.C., Abraham R.T.* // *Cell.* 2017. V. 10. № 170(4). P. 605–635.
26. *Sharma M., Dey C.S.* // *Cell Mol. Life Sci.* 2021. V. 78. № 23. P. 7873–7898.
27. *Koepsell H.* // *Pflugers Arch.* 2020. V. 472. № 9. P. 1299–1343.
28. *Rangaraju V., Calloway N., Ryan T.A.* // *Cell.* 2014. V. 156. P. 825–835.
29. *Piroli G.G., Grillo C.A., Hoskin E.K., Znamensky V., Katz E.B., Milner T.A., McEwen B.S., Charron M.J., Reagan L.P.* // *J. Comp. Neurol.* 2002. V. 452. P. 103–114.
30. *Sharma M., Yadav Y., Dey C.S.* // *J. Endocrinol.* 2023. V. 260. № 1. P. e230151.
31. *Bakke J., Haj F.G.* // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015. V. 37. P. 58–65.
32. *Thomas M.P., Erneux C., Potter B.V.* // *Chem-biochem.* 2017. V. 18. № 3. P. 233–247.
33. *Valencia M., Kim S.R., Jang Y., Lee S.H.* // *Biomol. Ther.* 2021. V. 29. № 6. P. 605–614.
34. *Zakharova I.O., Bayunova L.V., Avrova D.K., Avrova N.F.* // *J. Evol. Biochem. Phys.* 2024. V. 60. P. 57–71.
35. *Zakharova I.O., Sokolova T.V., Bayunova L.V., Zorina I.I., Rychkova M.P., Shpakov A.O., Avrova N.F.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 15. P. 3702.
36. *Duarte A.I., Proença T., Oliveira C.R., Santos M.S., Rego A.C.* // *Diabetes.* 2006. V. 55. № 10. P. 2863–2870.

37. Lioutas V.A., Alfaro-Martinez F., Bedoya F., Chung C.C., Pimentel D.A., Novak V. // *Transl. Stroke Res.* 2015. V. 6. № 4. P. 264–275.
38. Roger L.J., Fellows R.E. // *Endocrinol.* 1980. V. 106. № 2. P. 619–625.
39. Schubert M., Brazil D.P., Burks D.J., Kushner J.A., Ye J., Flint C.L., Farhang-Fallah J., Dikkes P., Warot X.M., Rio C., Corfas G., White M.F. // *J. Neurosci.* 2003. V. 6. № 23(18). P. 7084–7092.
40. Réthelyi J.M., Vincze K., Schall D., Glennon J., Berkel S. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2023. V. 153. P. 105330.
41. Lee C.C., Huang C.C., Hsu K.S. // *Neuropharmacol.* 2011. V. 61. P. 867–879.
42. Nemoto T., Yanagita T., Satoh S., Maruta T., Kanai T., Murakami M., Wada A. // *Neurochem. Int.* 2011. V. 59. P. 880–888.
43. de Bartolomeis A., De Simone G., De Prisco M., Barone A., Napoli R., Beguinot F., Billeci M., Fornaro M. // *Mol. Psych.* 2023. V. 28. № 7. P. 2811–2825.
44. Adzovic L., Domenici L. // *J. Neurochem.* 2014. V. 131. № 5. P. 582–587.
45. Trujeque-Ramos S., Castillo-Rolón D., Galarraga E., Tapia D., Arenas-López G., Mihailescu S., Hernández-López S. // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 345.
46. Fiory F., Perruolo G., Cimmino I., Cabaro S., Pignalosa F.C., Miele C., Beguinot F., Formisano P., Oriente F. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 868.
47. Martin H., Bullich S., Guiard B.P., Fioramonti X. // *J. Neuroendocrinol.* 2021. V. 33. № 4. P. e12928.
48. Kovacs P., Hajnal A. // *Neuropeptides.* 2009. V. 43. № 4. P. 283–293.
49. Talbot K., Wang H.Y., Kazi H., Han L.Y., Bakshi K.P., Stucky A., Fuino R.L., Kawaguchi K.R., Samoyedny A.J., Wilson R.S., Arvanitakis Z., Schneider J.A., Wolf B.A., Bennett D.A., Trojanowski J.Q., Arnold S.E. // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. № 4. P. 1316–1338.
50. Colagiuri S., Miller J. // *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002. V. 56 (Suppl 1). P. S30–S35.
51. Torsoni M.A., Carvalheira J.B., Pereira-Da-Silva M., de Carvalho-Filho M.A., Saad M.J., Velloso L.A. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. V. 285. № 1. P. E216–E323.
52. Rifkin R.F., Potgieter M., Ramond J.B., Cowan D.A. // *Evol. Appl.* 2017. V. 10. P. 949–964.
53. Romanatto T., Cesquini M., Amaral M.E., Roman E.A., Moraes J.C., Torsoni M.A., Cruz-Neto A.P., Velloso L.A. // *Peptides.* 2007. V. 28. № 5. P. 1050–1058.
54. van der Crabben S.N., Allick G., Ackermans M.T., Ender E., Romijn J.A., Sauerwein H.P. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 93. № 2. P. 638–641.
55. Brüning J.C., Gautam D., Burks D.J., Gillette J., Schubert M., Orban P.C., Klein R., Krone W., Müller-Wieland D., Kahn C.R. // *Science.* V. 289. № 5487. P. 2122–2125.
56. Koch L., Wunderlich F.T., Seibler J., Könnner A.C., Hampel B., Irlenbusch S., Brabant G., Kahn C.R., Schwenk F., Brüning J.C. // *J. Clin. Invest.* 2008. V. 118. P. 2132–2147.
57. Kleinridders A., Cai W., Cappellucci L., Ghazarian A., Collins W.R., Vienberg S.G., Pothos E.N., Kahn C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2015. V. 17. № 112(11). P. 3463–3468.
58. Soto M., Cai W., Konishi M., Kahn C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 13. P. 6379–6384.
59. Grillo C.A., Piroli G.G., Lawrence R.C., Wrihten S.A., Green A.J., Wilson S.P., Sakai R.R., Kelly S.J., Wilson M.A., Mott D.D., Reagan L.P. // *Diabetes.* 2015. V. 64. № 11. P. 3927–3936.
60. Schubert M., Gautam D., Surjo D., Ueki K., Baudler S., Schubert D., Kondo T., Alber J., Galldiks N., Küstermann E., Arndt S., Jacobs A.H., Krone W., Kahn C.R., Brüning J.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 2. № 101(9). P. 3100–3105.
61. Liu Y., Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Gong C.X. // *J. Pathol.* 2011. V. 225. P. 54–62.
62. Anê G.F., Caperuto L.C., Pereira-Da-Silva M., Souza L.C., Hirata A.E., Velloso L.A., Cipolla-Neto J., Carvalho C.R. // *J. Neurochem.* 2004. V. 90. P. 559–566.
63. Faria J.A., Kinote A., Ignacio-Souza L.M., de Araújo T.M., Razolli D.S., Doneda D.L., Paschoal L.B., Lellis-Santos C., Bertolini G.L., Velloso L.A., Bordin S., Anê G.F. // *Am. J. Physiol.* 2013. V. 305. P. 230–242.
64. Shen S., Liao Q., Wong Y.K., Chen X., Yang C., Xu C., Sun J., Wang J. // *Int. J. Biol. Sci.* 2022. V. 1. № 18(3). P. 983–994.
65. Verdile G., Keane K.N., Cruzat V.F., Medic S., Sabale M., Rowles J., Wijesekara N., Martins R.N., Fraser P.E., Newsholme P. // *Mediators Inflamm.* 2015. V. 2015. P. 105828.
66. Vinuesa A., Pomilio C., Gregosa A., Bentivegna M., Presa J., Bellotto M., Saravia F., Beauquis J. // *Front. Neurosci.* 2021. V. 23. № 15. P. 653651.
67. Schell M., Chudoba C., Leboucher A., Alfine E., Flore T., Ritter K., Weiper K., Wernitz A., Henkel J., Kleinridders A. // *Nutrients.* 2020. V. 23. № 12(5). P. 1518.
68. Perreault M., Marette A. // *Nat. Med.* 2001. V. 7. P. 1138–1143.
69. Katashima C.K., Silva V.R.R., Lenhare L., Marin R.M., Carvalheira J.B.C. // *Sci. Rep.* 2017. V. 23. № 7(1). P. 9265.
70. Lennicke C., Cochemé H.M. // *Redox Biol.* 2021. V. 42. P. 101964.
71. Maciejczyk M., Żebrowska E., Chabowski A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 18. № 20(4). P. 874.

72. Maciejczyk M., Żebrowska E., Zalewska A., Chabowski A. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018. V. 2018. P. 6940515.
73. Kleinridders A., Lauritzen H.P., Ussar S., Christensen J.H., Mori M.A., Bross P., Kahn C.R. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. № 11. P. 4667–4680.
74. Vancampfort D., Stubbs B., Mitchell A.J., De Hert M., Wampers M., Ward P.B., Rosenbaum S., Correll C.U. // *World psychiatry.* 2015. V. 14. № 3. P. 339–347.
75. Mansur R.B., Delgado-Peraza F., Subramaniapillai M., Lee Y., Iacobucci M., Nasri F., Rodrigues N., Rosenblatt J.D., Brietzke E., Cosgrove V.E., Kramer N.E., Suppes T., Raison C.L., Fagiolini A., Rasgon N., Chawla S., Nogueiras-Ortiz C., Kapogiannis D., McIntyre R.S. // *J. Psychiatr. Res.* 2021. V. 133. P. 82–92.
76. McIntyre R.S., Soczynska J.K., Woldeyohannes H.O., Miranda A., Vaccarino A., Macqueen G., Lewis G.F., Kennedy S.H. // *Bipolar Disord.* 2012. V. 14. № 7. P. 697–706.
77. Mansur R.B., Ahmed J., Cha D.S., Woldeyohannes H.O., Subramaniapillai M., Lovshin J., Lee J.G., Lee J.H., Brietzke E., Reininghaus E.Z., Sim K., Vinberg M., Rasgon N., Hajek T., McIntyre R.S. // *J. Affect. Disord.* 2017. V. 207. P. 114–120.
78. Aftab A., Kemp D.E., Ganocy S.J., Schinagle M., Conroy C., Brownrigg B., D'Arcangelo N., Goto T., Woods N., Serrano M.B., Han H., Calabrese J.R., Gao K. // *J. Affect. Disord.* 2019. V. 245. P. 957–964.
79. Gruber J., Hanssen R., Qubad M., Bouzouina A., Schack V., Sochor H., Schiweck C., Aichholzer M., Matura S., Slattery D.A., Zopf Y., Borgland S.L., Reif A., Thanarajah S.E. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2023. V. 149. P. 105179.
80. Areias M.F., Prada P.O. // *Behav. Brain Res.* 2015. V. 282. P. 209–217.
81. Kullmann S., Heni M., Hallschmid M., Fritsche A., Preissl H., Häring H.U. // *Physiol. Rev.* 2016. V. 96. № 4. P. 1169–1209.
82. Singh M.K., Leslie S.M., Packer M.M., Zaiko Y.V., Phillips O.R., Weisman E.F., Wall D.M., Jo B., Rasgon N. // *Horm. Behav.* 2019. V. 108. P. 73–83.
83. Yang W., Zheng L., Zheng B., Zeng S., Li J., Liang B., Zhu J., Zhang M. // *Psychiatr. Danub.* 2020. V. 32. P. 46–54.
84. Thomas E.H.X., Bozaoglu K., Rossell S.L., Gurvich C. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017. V. 77. P. 369–387.
85. Müller N. // *Schizophr. Bull.* 2018. V. 44. № 5. P. 973–982.
86. Boksha I.S., Prokhorova T.A., Savushkina O.K., Tereshkina E.B., Vorobyeva E.A., Burbaeva G.Sh. // *Neurochem. J.* 2023. V. 17. P. 676–690.
87. Zhao Z., Ksiezak-Reding H., Riggio S., Haroutunian V., Pasinetti G.M. // *Schizophr. Res.* 2006. V. 84. P. 1–14.
88. Chadha R., Meador-Woodruff J. // *Schizophr. Bull.* 2018. V. 44. P. S400.
89. Wijtenburg S.A., Kapogiannis D., Korenic S.A., Mullins R.J., Tran J., Gaston F.E., Chen S., Mustapic M., Hong L.E., Rowland L.M. // *Schizophr. Res.* 2019. V. 208. P. 324–330.
90. Maldonado J.R. // *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 2018. V. 33. P. 1428–1457.
91. Duggan E.W., Carlson K., Umpierrez G.E. // *Anesthesiology.* 2017. V. 126. № 3. P. 547–560. Erratum in: *Anesthesiology.* 2018. V. 129. № 5. P. 1053.
92. Svanfeldt M., Thorell A., Hausel J., Soop M., Nygren J., Ljungqvist O. // *Clin. Nutr.* 2005. V. 24. P. 815–821.
93. Chen Y., Run X., Liang Z., Zhao Y., Dai C.L., Iqbal K., Liu F., Gong C.X. // *Front. Aging Neurosci.* 2014. V. 6. P. 100.
94. Zhang Y., Dai C.L., Chen Y., Iqbal K., Liu F., Gong C.X. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 21186.
95. Li X., Run X., Wei Z., Zeng K., Liang Z., Huang F., Ke D., Wang Q., Wang J.Z., Liu R., Zhang B., Wang X. // *Curr. Alzheimer Res.* 2019. V. 16. P. 8–18.
96. Yu Q., Dai C.L., Zhang Y., Chen Y., Wu Z., Iqbal K., Liu F., Gong C.X. // *J. Alzheimers Dis.* 2019. V. 70. P. 925–936.
97. Huang Q., Li Q., Qin F., Yuan L., Lu Z., Nie H., Gong G. // *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 2021. V. 29. P. 1202–1211.
98. Bramlett H.M., Dietrich W.D. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004. V. 24. P. 133–150.
99. Llompart-Pou J.A., Raurich J.M., Pérez-Bárcena J., Barceló A., Ibáñez J., Ayestarán J.I. // *Neurocrit. Care.* 2008. V. 9. P. 230–236.
100. Shaughness M., Acs D., Brabazon F., Hockenbury N., Byrnes K.R. // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. P. 547175.
101. Arora P., Singh K., Kumari M., Trivedi R. // *Metabolomics.* 2022. V. 18. P. 28.
102. Karelina K., Sarac B., Freeman L.M., Gaier K.R., Weil Z.M. // *Eur. J. Neurosci.* 2016. V. 43. P. 1034–1043.
103. Franklin W., Krishnan B., Tagliabate G. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 8228.
104. Freeman L.M., Gaier K.R., Weil Z.M. // *Eur. J. Neurosci.* 2016. V. 43. P. 1034–1043.
105. Yasmin A., Jokivarsi K., Poutiainen P., Pitkänen A., Gröhn O., Immonen R. // *Brain Res.* 2022. V. 1788. P. 147934.
106. Zhou X., Kang C., Hu Y., Wang X. // *Front. Public Health.* 2023. V. 11. P. 1021378.
107. Ho L., Qin W., Pompl P.N., Xiang Z., Wang J., Zhao Z., Peng Y., Cambareri G., Rocher A., Mobbs C.V., Hof P.R. // *FASEB J.* 2004. V. 18. P. 902–904.
108. Vannucci S.J., Willing L.B., Goto S., Alkayed N.J., Brucklacher R.M., Wood T.L., Towfighi J., Hurn P.D., Simpson I.A. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001. V. 21. P. 52–60.

109. Kim B., Sullivan K.A., Backus C., Feldman E.L. // Antioxid. Redox Signal. 2011. V. 14. P. 1829–1839.
110. Muniyappa R., Chen H., Montagnani M., Sherman A., Quon M.J. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2020. V. 319. № 3. P. E629–E646.
111. Sojitra M.H., Garg V.S., Shah K., Joshi S., Vadnagara H., Gandhi S.K., Patel P. // Cureus. 2023. V. 15. № 10. P. e48034.
112. Nijssen K.M.R., Mensink R.P., Joris P.J. // Neuroendocrinol. 2023. V. 113. № 1. P. 1–13.
113. Kullmann S., Heni M., Fritsche A., Preissl H. // J. Neuroendocrinol. 2015. V. 27. № 6. P. 419–423.
114. Weinstein A.M. // Front. Behav. Neurosci. 2023. V. 17. P. 1123733.
115. Tschritter O., Preissl H., Hennige A.M., Stumvoll M., Porubska K., Frost R., Marx H., Klösel B., Lutzenberger W., Birbaumer N., Häring H.U., Fritsche A. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2006. V. 103. № 32. P. 12103–12108.
116. Tschritter O., Preissl H., Yokoyama Y., Machicao F., Häring H.U., Fritsche A. // Diabetologia. 2007. V. 50. № 12. P. 2602–2603.
117. Rebelos E., Rinne J.O., Nuutila P., Ekblad L.L. // J. Clin. Med. 2021. V. 10. № 7. P. 1532.
118. Heni M. // Diabetologia. 2024. V. 67. P. 1181–1191.
119. Zorina I.I., Avrova N.F., Zakharova I.O., Shpakov A.O. // Biochem. (Mosc). 2023. V. 88. P. 374–391.
120. Frey W.H. II // US Patent 6,313,093 B1 filed 1999 and issued November 6, 2001.
121. Schmid V., Kullmann S., Gfrörer W., Hund V., Hallschmid M., Lipp H.P., Häring H.U., Preissl H., Fritsche A., Heni M. // Diabetes Obes. Metab. 2018. V. 20. № 7. P. 1563–1577.
122. Novak V., Mantzoros C.S., Novak P., McGlinchey R., Dai W., Lioutas V., Buss S., Fortier C.B., Khan F., Aponte Becerra L., Ngo L.H. // J. Neurol. 2022. V. 269. P. 4817–4835.
123. Zhang H., Hao Y., Manor B., Novak P., Milberg W., Zhang J., Fang J., Novak V. // Diabetes. 2015. V. 64. № 3. P. 1025–1034.
124. Xu L.B., Huang H.D., Zhao M., Zhu G.C., Xu Z. // Neurocrit. Care. 2021. V. 34. P. 154–166.
125. Zakharova I.O., Bayunova L.V., Zorina I.I., Sokolova T.V., Shpakov A.O., Avrova N.F. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 11768.
126. Smith C.J., Sims S-K., Nguyen S., Williams A., McLeod T., Sims-Robinson C. // J. Neurosci. Res. 2023. V. 101. P. 1757–1769.
127. Sanderson T.H., Kumar R., Murariu-Dobrin A.C., Page A.B., Krause G.S., Sullivan J.M. // Neurol. Res. 2009. V. 31. P. 947–958.
128. Brabazon F., Wilson C.M., Jaiswal S., Reed J., Frey W.H. Nd., Byrnes K.R. // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2017. V. 37. P. 3203–3218.

Brain Insulin Resistance in Neurological Disorders of Various Genesis: Current State and Treatment Approaches

I. I. Zorina¹ and A. O. Shpakov¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
Saint Petersburg, Russia*

Nowadays, the phenomenon insulin resistance (IR) has expanded and include not only peripheral, but also central IR. However, the underlying mechanisms and physiological manifestations in the central nervous system differ from those on the periphery, and currently the concept of central IR has undergone significant changes. There are abundant evidences of the development of the nervous tissue weakened response to insulin, which directly or indirectly mediates the etiology and pathogenesis of many neurological disorders. Some molecular mechanisms underlying the decrease in the sensitivity of neurons and glial cells to insulin entering from the bloodstream to the central nervous system have been deciphered. This review is devoted to the analysis of the brain IR mechanisms in mental disorders, ischemic and traumatic brain injuries, anesthesia and postoperative stress, as well as cognitive deficits, including those associated with Alzheimer's disease. Approaches to the diagnosis and treatment of pathological brain conditions caused by central IR are also discussed.

Keywords: central insulin resistance, diabetes mellitus, neurological disorders, intranasally administered insulin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 612.82; 577.2; 57.026

СНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ Vcl-xL В ГИППОКАМПЕ КРЫС
АССОЦИИРОВАНО С ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫМ ФЕНОТИПОМ

© 2024 г. Г. Т. Шишкина^{1, *}, Д. А. Ланшаков¹, А. В. Баннова¹, Н. П. Комышева¹,
Н. Н. Дыгало¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 05.07.2024 г.

После доработки 10.07.2024 г.

Принята к публикации 18.07.2024 г.

Выявленная ранее способность анти-апоптозного белка Vcl-xL к повышению экспрессии в гиппокампе в ответ на стресс, коррелировавшая с устойчивостью к индукции стрессом депрессии [1], указывает на потенциальную возможность использования этого белка в качестве мишени для ослабления симптомов депрессивного расстройства. Целью настоящей работы было оценить на крысах влияние подавления экспрессии Vcl-xL в гиппокампе (с помощью TET-ON системы на основе лентивирусных векторов для контролируемой доксициклином экспрессии трансгенов) на поведение в тесте принудительного плавания. Обнаруженное снижение экспрессии (определяли иммуноблотом) Vcl-xL в гиппокампе и менее выраженное во фронтальной коре сопровождалось отчетливым депрессивно-подобным эффектом, проявляющимся меньшим латентным периодом до первого эпизода замирания и большей продолжительностью пассивного поведения. У животных, получавших совместное введение вектора и доксициклина, также обнаружено достоверное увеличение экспрессии белка мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в гиппокампе, относительного веса надпочечников и снижение стрессорного уровня кортикостерона в плазме крови по сравнению с группами, получавшими отдельные введения этих препаратов. Относительные веса надпочечников достоверно отрицательно коррелировали с уровнем экспрессии Vcl-xL во фронтальной коре. В целом ген-направленное снижение экспрессии Vcl-xL в гиппокампе приводило у крыс к депрессивно-подобному ответу в тесте принудительного плавания. Этому поведенческому эффекту сопутствовало изменение функционирования надпочечников, проявляющееся увеличением веса желез и снижением стрессорного уровня кортикостерона в периферической циркуляции.

Ключевые слова: анти-апоптозный белок Vcl-xL, мозговой нейротрофический фактор (BDNF), гиппокамп, фронтальная кора, тест принудительного плавания, кортикостерон, надпочечники

DOI: 10.31857/S1027813324030024, EDN: EQVQHW

ВВЕДЕНИЕ

Внешние стрессовые обстоятельства могут провоцировать развитие депрессивных расстройств, как у людей, так и в экспериментальных исследованиях на животных [2, 3]. Вместе с тем, большинство индивидуумов, столкнувшихся даже с тяжелым стрессом, сохраняют нормальные поведенческие функции, что инициировало проверку возможности терапии обусловленных стрессом психопатологий путем стимулирования у чувствительных особей механизмов естественной устойчивости [4].

Экспериментальные исследования эффектов перенесенного стресса и антидепрессантных

воздействий на животных выявили в центральной нервной системе множество изменений различных систем и функций, среди которых изменения процессов апоптоза и нейрогенеза [5–10] оказались тесно связанными с развитием депрессии и ослаблением ее симптомов. Важную роль в регуляции клеточной пролиферации и жизнеспособности нейронов играют мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и анти-апоптозные белки. В связи с психопатологиями, большее внимание исследователей исторически привлекал антиапоптозный белок Vcl-2 [11], в то время как интерес к Vcl-xL возник сравнительно недавно. В 2008 году были опубликованы фактически первые результаты о снижении

экспрессии Bcl-xL в гиппокампе крыс хроническими стрессовыми воздействиями, индуцирующими депрессивно-подобное поведение [12]. Однако в ответах Bcl-xL на стресс обнаружились индивидуальные особенности, которые оказались причастными к определению поведенческой восприимчивости или устойчивости к стрессорным воздействиям. Выявленная у части животных способность к повышению экспрессии анти-апоптозного белка Bcl-xL в гиппокампе в ответ на стресс коррелировала с устойчивостью к индукции стрессом депрессии [13], что позволяет причислять этот белок к участникам механизма естественной устойчивости к индуцируемой стрессом депрессии. Повышение экспрессии может представлять, таким образом, потенциальную терапевтическую стратегию для уменьшения симптомов депрессивного расстройства [1, 14], что подтверждается повышающим влиянием на экспрессию некоторых средств антидепрессантной терапии [12, 15-19].

Bcl-xL выполняют нейропротективную функцию [20, 21], поэтому снижение его уровня в мозге, сопровождающее стрессовое воздействие, предположительно может способствовать наблюдаемому усилению гибели нервных клеток и развитию депрессии. Однако будет ли снижение экспрессии этих белков реально инициировать развитие депрессии, оставалось неясным. Для ответа на этот вопрос в представленной работе на крысах было проведено исследование влияния подавления экспрессии Bcl-xL в гиппокампе на поведение в тесте принудительного плавания. Были определены также экспрессии Bcl-xL и BDNF в гиппокампе и фронтальной коре, уровни кортикостерона и интерлейкина-6 в периферической крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работу проводили на взрослых самцах крыс (Wistar) массой тела 200–250 г, содержащихся в виварии ИЦиГ СО РАН в условиях контролируемого светового режима (14 ч свет/10 ч темнота) со свободным доступом к воде и корму. В работе следовали рекомендациям о гуманном обращении с лабораторными животными Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2012 г.) и рекомендациям Минздрава России (приложение к приказу № 267 от 19 июня 2003 г.), а также директивам Совета Европы (86/609/ЕЕС).

Схема эксперимента. Для подавления экспрессии Bcl-xL в гиппокампе была использована TET-ON система на основе лентивирусных векторов для контролируемой доксициклином экспрессии трансгенов [22]. Для экспрессии химерного белка тетрациклинового репрессора с транскрипционным репрессором KRAB использовали вектор pLVUT-tTR-KRAB. Последовательности, кодирующие малые ингибирующие шпильковые РНК (shRNA), находились под контролем промотора H1-TetO. Два варианта короткой шпильки (табл. 1), нацеленные на Bcl-xL, были идентифицированы с использованием BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen) и клонированы в pLVTHM с использованием сайтов рестрикции MluI, ClaI.

Оценку эффективности нокдауна каждого варианта shRNA проводили на первичных клетках фибробластов крысы с трансфекцией плазмидной ДНК с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Только вариант sh#2 снижал экспрессию Bcl-xL в два раза по сравнению с контролем через 48 часов после трансфекции [$F(3, 16)=5.3526$, $p=0.01$] (рис. 1).

Этот вариант shRNA (sh#2) был использован для производства лентивирусного вектора (Tg), который в объеме 5 мкл вводили в стереотаксисе под наркозом (кетамин/ксилазин) билатерально в область CA1 гиппокампа по следующим координатам: ± 1.5 мм медиально/латерально, -3 мм спереди/сзади, -2.7 мм дорсально/вентрально от брегмы. Через 2 недели после введения вектора, половина животных в течение 7-ми дней получала с питьевой водой доксициклин (Dox; 2 г/мл в 5% сахарозе) (Tg+Dox). Третья группа животных получала только Dox в режиме Tg+Dox.

На 6 и 7 дни проводили претестовые и тестовые сессии теста принудительного плавания (тест Порсолта; 11–13 животных в группе). Через 30 мин после тестовой сессии у животных после быстрой декапитации собирали плазму крови для определения у выбранных случайным образом 7-8 животных в каждой группе уровней кортикостерона и интерлейкина-6 иммуноферментным методом с помощью наборов (Assay Designs, Inc., USA). На холоде быстро выделяли гиппокамп и фронтальную кору для определения белков (иммуноблотом) Bcl-xL и BDNF.

Тест принудительного плавания. Тест проводили согласно протоколу, предложенному еще в 1977 г. для преclinical оценки антидепрессантной

Таблица 1. Варианты коротких шпилек, нацеленных на Bcl-xL

sh#1	CACCGCATTCAGTGATCTAACATCCCGAAGGATGTTAGATCACTGAATGCTTTT
sh#2	CACCGGACAGCATATCAGAGCTTTGCGAACAAAGCTCTGATATGCTGTCCSTTTT

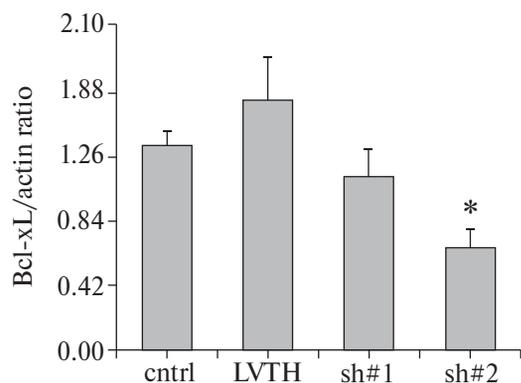


Рис. 1. Оценка эффективности нокдауна Bcl-xL вариантами shRNA: sh#1 и sh#2, в первичных клетках фибробластов крысы через 48 часов после трансфекции. * - $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой.

эффективности препаратов [23]. В классическом варианте для крыс [24] принудительное плавание применяется, как правило, один раз в день в течение двух последовательных дней, 15 минут в первый день (претест) и 5 минут – во второй день (тестовая сессия). Поведение животных, помещенных в стеклянный цилиндр (46 × 20 см), наполненный водой до высоты 30 см, записывали с помощью видеокамеры для последующего определения латентного времени до первого эпизода депрессивно-подобного поведения и суммарной продолжительности этого поведения.

Иммуноблот. Уровни белков Bcl-xL и BDNF определяли методом Вестерн блота как описано ранее [25]. Образцы гиппокампа и фронтальной коры гомогенизировали в лизирующем буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, 1% Тритон X-100, и ингибиторы протеаз: 2 мМ PMSF (фенилметилсульфонилфторид, phenylmethyl sulphonyl fluoride) и по 2 мкг/мл леупептина, пепстатина и апротинина. Супернатант, содержащий 50 мкг белка, разделяли электрофорезом в 12% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (система Mini-Protean 3 Dodeca Cell, “Bio-Rad Laboratories”, США) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Laboratories, США) диаметром 0.45 мкм (система Trans-Blot, “Bio-Rad Laboratories”, США). Детекцию исследуемых белков на мембране проводили с помощью первичных антител – кроличьих поликлональных антител к BDNF (разведение 1:500; кроличьи поликлональные антитела, N-20, sc-546, Santa Cruz Biotechnology, США), Bcl-xL (разведение 1:500; кроличьи моноклональные антитела, #2764, 54Н6, Cell Signaling Technology, США) и бета-актину (разведение 1:20000; кроличьи поликлональные антитела, I-19, sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, США). Вторичные анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (IgG, Bio-Rad

Laboratories, США) использовали в разведении 1:1000 для окрашивания BDNF и Bcl-xL и в разведении 1:10000 для окрашивания бета-актина. Затем усиливали хемилюминисцентный сигнал с помощью специального набора (Chemiluminescence kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, “Life Technologies”, США) в течение 1 мин. Интенсивность окрашивания полос, соответствующих анализируемым белкам, определяли путем сканирования мембран (Chemidoc™ Touch Imaging System, Bio-Rad Laboratories, США) с последующей компьютерной денситометрией (программа Scion Image 4.0.3.2, Scion Corporation, США). Количество белков BDNF и Bcl-xL выражали в относительных единицах к бета-актину того же образца.

Статистический анализ. Полученные данные после проверки их соответствия нормальному распределению (использовали для этого критерий Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса) обрабатывали с применением однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), t-критерия Стьюдента, а также корреляционного анализа (по Пирсону). Результаты поведенческих тестов анализировались с использованием ANOVA для повторных измерений с “группой” в качестве фактора. Результаты представлены как $M \pm m$. Эффекты считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние внутригиппокампальной инъекции вектора отдельно и совместно с потреблением доксициклина с питьевой водой на уровни белков Bcl-xL и BDNF в гиппокампе и фронтальной коре. Добавление доксициклина в питьевую воду крыс, получавших введения вектора, вызвало нокдаун Bcl-xL в гиппокампе [$F(2,19)=5.7934$, $p=0.0109$]. Общий уровень белка Bcl-xL в этой структуре снизился примерно до 69.1% по сравнению с контрольными животными, получавшими только Dox ($p < 0.05$), и до 75 по сравнению с Tg ($p < 0.05$) (рис. 2а).

Во фронтальной коре также наблюдалось, хотя и менее выраженное [$F(2,18) = 3.2113$, $p = 0.06417$], понижающее влияние совместного введения вектора и антибиотика на экспрессию Bcl-xL (рис. 2б). Прямые сравнения отдельных групп по t-критерию Стьюдента показали достоверные различия между группами Tg+Dox и Dox: $t(13) = -2.549784$, $p = 0.024202$, и на уровне выраженной тенденции между Tg+Dox и Tg: $t(14) = -2.107102$; $p = 0.056824$.

Введение вектор+доксициклин, подавляющего экспрессию Bcl-xL, привело в гиппокампе, помимо снижения уровня анти-апоптозного белка, к небольшому: $F(2,20) = 2.8767$, $p = 0.07979$, увеличению экспрессии белка BDNF (рис. 2в). Прямые парные сравнения по t-критерию Стьюдента

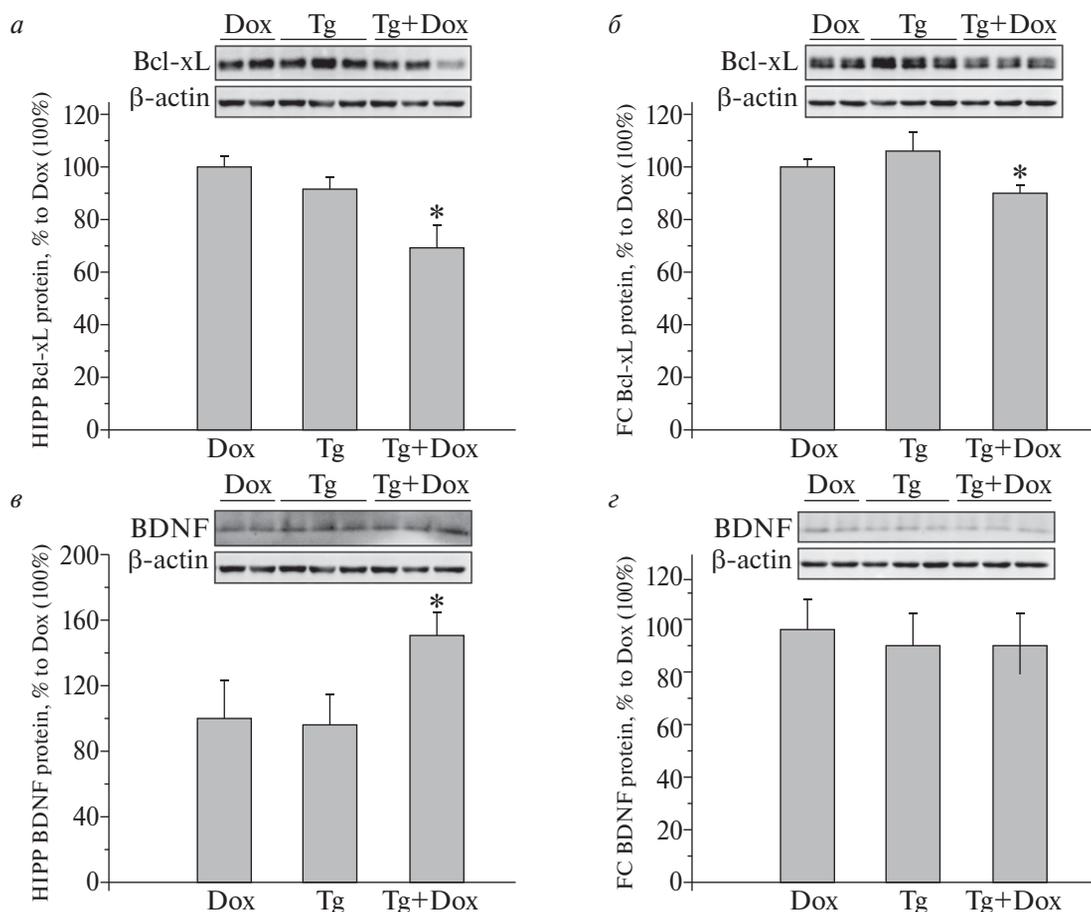


Рис. 2. Уровни белков Bcl-xL (*a, б*) и BDNF (*в, з*) в гиппокампе (*a, в*) и фронтальной коре (*б, з*) взрослых крыс, получавших внутригиппокампальные инъекции лентивирусного вектора и доксициклин с питьевой водой отдельно и совместно. Dox – доксициклин, Tg – лентивирусный вектор, Tg+Dox – лентивирусный вектор с последующим потреблением доксициклина. Значения $M \pm m$ представлены в процентах относительно группы Dox, принятой за 100%; в каждой группе 7–8 животных. Звездочками указаны различия между группами: на (*a*) – $p < 0.05$ по сравнению с группами Dox и Tg; на (*б*) – $p < 0.05$ по сравнению с группой Dox, с группой Tg на уровне выраженной тенденции – $p = 0.0568$; на (*в*) – $p < 0.05$ по сравнению с обеими контрольными группами.

показали достоверные различия между группами Tg и Tg+Dox: $t(14) = 2.34143$; $p = 0.034522$. Во фронтальной коре различий между группами по экспрессии BDNF не обнаружено (рис. 2*з*).

Поведение в тесте принудительного плавания.

В претесте не было обнаружено различий между группами по значениям поведенческих параметров (рис. 3*а, б*). Использование ANOVA для повторных измерений поведения показал для латентного времени до первого замирания достоверное влияние повторного тестирования [$F(1,32) = 28.586$, $p = 0.000007$] и взаимодействие факторов (подавления экспрессии и повторного тестирования) [$F(1,32) = 3.980$, $p = 0.028598$]. Для продолжительности замирания у животных групп Tg и Tg+Dox достоверными были влияние группы [$F(1,22) = 4.674$, $p = 0.041760$] и повторного тестирования [$F(1,22) = 19.470$, $p = 0.000220$]. В 5-минутной тестовой сессии, проведенной через сутки после

претеста, животные с подавлением экспрессии Bcl-xL в гиппокампе демонстрировали достоверно меньшую продолжительность латентного времени до первого замирания (рис. 3*а*), то есть, по сравнению с группой Tg, они быстрее впадали в депрессивно-подобное состояние. Кроме того, эти животные характеризовались большей продолжительностью замирания в тесте (рис. 3*б*).

Вес надпочечников и уровень кортикостерона в плазме крови.

У животных, получавших совместное введение вектора и доксициклина, обнаружено достоверное увеличение относительного веса надпочечников по сравнению с группами, получавшими отдельные введения этих препаратов (рис. 4*а*) [$F(2,19) = 4.1234$, $p = 0.03468$].

Дисперсионный анализ показал достоверное влияние перенесенных воздействий также на уровень кортикостерона [$F(2,19) = 4.6480$, $p = 0.02274$]. Уровень гормона, измеренный в плазме

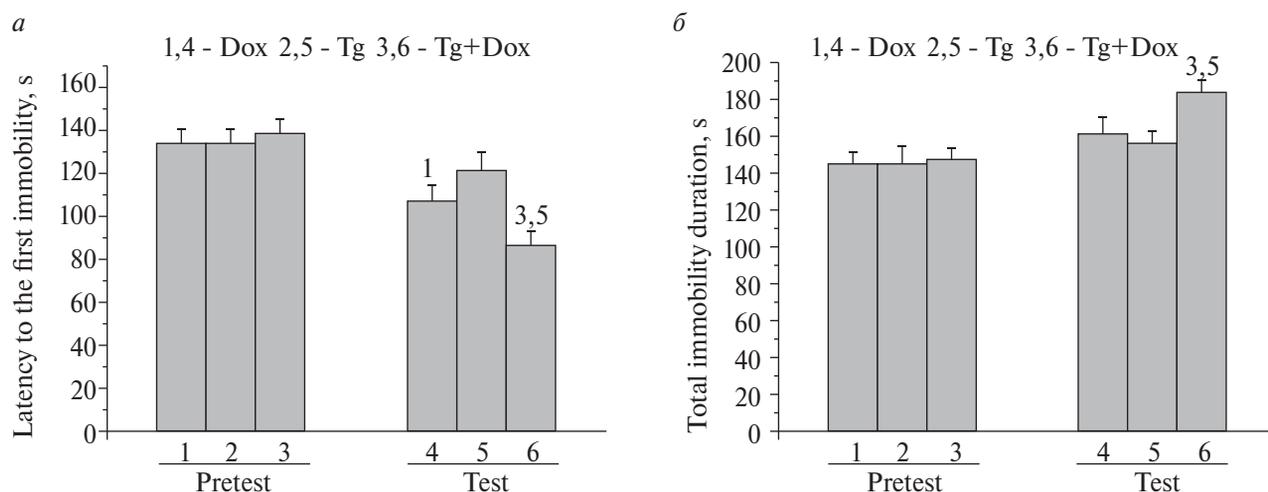


Рис. 3. Латентное время до первого замирания (а) и общая продолжительность замирания (б) взрослых крыс, получавших внутригиппокампальные инъекции лентивирусного вектора и доксициклин с питьевой водой отдельно и совместно, в претестовой и тестовой сессиях теста принудительного плавания. Dox – доксициклин, Tg – лентивирусный вектор, Tg+Dox – лентивирусный вектор с последующим потреблением доксициклина; в каждой группе 11–13 животных. Цифрами сверху указаны группы, между которыми выявлены достоверные отличия ($p < 0.05$).

крови через 30 минут после стресса принудительного плавания, был достоверно ($p < 0.05$) снижен у животных группы Tg+Dox по сравнению с группой Tg (рис. 4б).

Интерлейкин-6 в плазме крови. Характер изменений уровня интерлейкина-6 в плазме крови через 30 минут после стресса принудительного плавания был сходен с изменениями уровня кортикостерона, однако различия между группами были значительно менее выраженными и, также как

и общий эффект [$F(2, 18) = 1.8784, p = 0.18160$], не достигали статистической достоверности (рис. 5).

Корреляции. Относительные веса надпочечников достоверно отрицательно коррелировали с уровнем экспрессии Vcl-xL во фронтальной коре: $r = -0.42$ ($n=23$) $p < 0.05$.

Между уровнями кортикостерона и интерлейкина-6 в плазме крови через 30 минут после стресса принудительного плавания обнаружена достоверная положительная корреляция: $r = 0.44$ ($n=21$) $p < 0.05$.

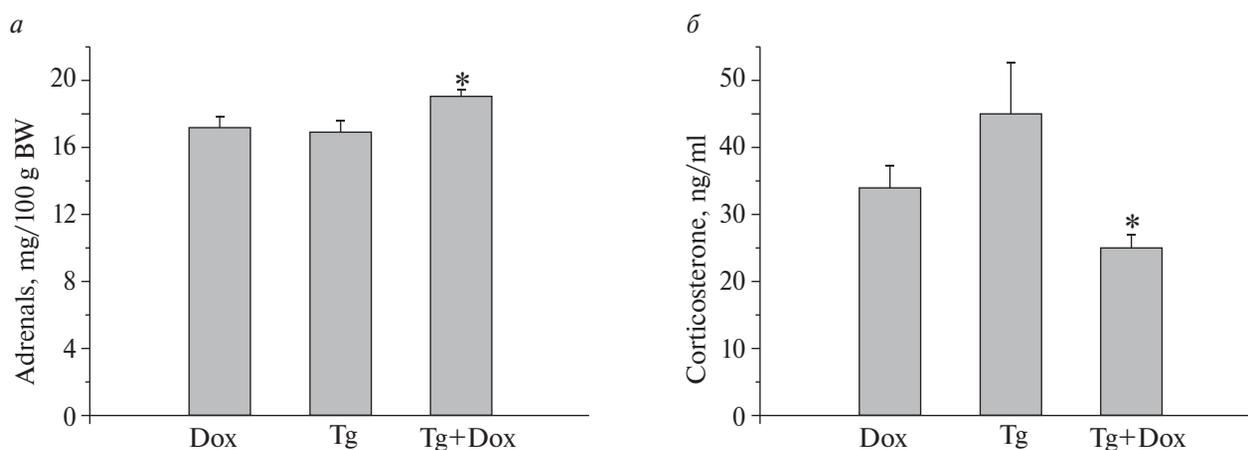


Рис. 4. Относительные веса надпочечников (а) и стрессорные уровни кортикостерона (б) в плазме периферической крови взрослых крыс, получавших внутригиппокампальные инъекции лентивирусного вектора и доксициклин с питьевой водой отдельно и совместно. Dox – доксициклин, Tg – лентивирусный вектор, Tg+Dox – лентивирусный вектор с последующим потреблением доксициклина; в каждой группе 7–8 животных. На (а) – * $p < 0.05$ по сравнению с группами Dox; на (б) – * $p < 0.05$ по сравнению с группой Tg.

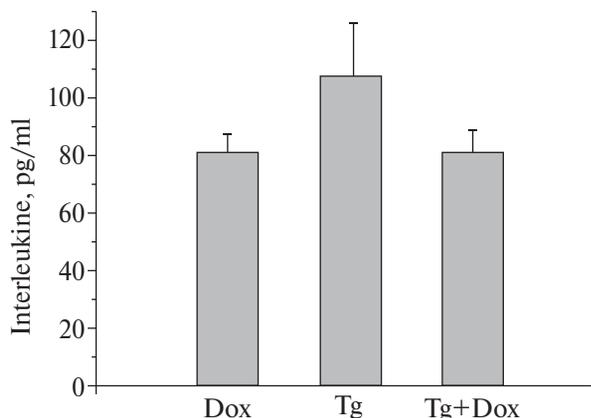


Рис. 5. Стрессорные (через 30 минут после стресса принудительного плавания) уровни интерлейкина-6 в плазме периферической крови взрослых крыс, получавших внутригиппокампальные инъекции лентивирусного вектора и доксициклин с питьевой водой отдельно и совместно. Dox – доксициклин, Tg – лентивирусный вектор, Tg+Dox – лентивирусный вектор с последующим потреблением доксициклина; в каждой группе 7–8 животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом работы явилось впервые обнаруженное увеличение депрессивно-подобного поведения у животных после ген-направленного подавления экспрессии Bcl-xL в гиппокампе. В 5-минутной тестовой сессии, животные со сниженной экспрессией Bcl-xL в гиппокампе проявляли достоверно большую продолжительность замирания. Помимо продолжительности пассивного поведения, для улучшения прогностической достоверности теста был использован дополнительный показатель – латентный период до первого эпизода замирания [26], уменьшение которого свидетельствовало также и о более быстром развитии депрессивно-подобного состояния у этих животных.

Выявленный про-депрессивно-подобный поведенческий эффект мог быть реально связан со снижением экспрессии Bcl-xL, обнаруженным не только в гиппокампе, но и во фронтальной коре. Хронический непредсказуемый умеренный стресс активировал апоптоз в гиппокампе и коре мышей, а также значительно увеличивал продолжительность пассивного поведения в тесте принудительного плавания [27]. Исследования, проведенные на ранних постнатальных стадиях, показали, что дефицит Bcl-xL в коре и CA1-CA3 областях гиппокампа индуцировал апоптоз в популяции дифференцированных нейронов, регулирующих сложное поведение [28]. PGAM5 (Bcl-xL-Binding Protein V68) дефосфорилирует Bcl-xL и препятствует тем самым апоптозу [29]. Недавно было обнаружено, что нокауты по PGAM5 проявляют

депрессивно-подобное поведение, а хронический стресс, провоцирующий депрессивно-подобное поведение, снижал экспрессию PGAM5 в префронтальной коре и гиппокампе [30]. Авторы считают, что одним из механизмов провоцирования депрессивно-подобного поведения снижением экспрессии PGAM5 является ограничение продукции АТФ в нейронах, приводящее к уменьшению количества нейрональных шипиков в префронтальной коре. Хотя Bcl-xL в основном известен своей ролью в регуляции апоптоза, и как анти-апоптотический фактор он может предотвращать гибель нейронов, Bcl-xL имеет и неканонические функции, независимые от апоптоза [31]. Показано, например, его участие в росте и дифференцировке нейронов и аксонов [32, 33], синаптической трансмиссии [34], а также, посредством регуляции митохондриального метаболизма, в образовании синапсов [35, 36].

Наряду с поведенческими изменениями, последствия снижения экспрессии Bcl-xL в гиппокампе и фронтальной коре включали значительные различия в функциональной активности надпочечников, что проявилось увеличением веса желез и снижением стрессорного уровня кортикостерона в плазме крови животных. Несмотря на общепринятое мнение о связи повышенного уровня глюкокортикоидов с развитием психопатологией, функциональное значение этих гормонов для инициации первых эпизодов стресс-индуцированного депрессивно-подобного поведения остается до конца не изученным. Увеличение уровня глюкокортикоидов при стрессе участвует в реакциях преодоления стресса, и можно думать, что снижение их уровня в некоторых случаях может способствовать развитию депрессивно-подобного поведения, что, например, согласуется с ослаблением депрессивно-подобного поведения однократным введением кортикостерона [37]. Вместе с тем, полученный нами результат указывает на явную разбалансировку гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, механизмы которой, а также отношение к поведенческим эффектам не ясны. Относительные веса надпочечников отрицательно коррелировали с уровнем экспрессии Bcl-xL во фронтальной коре, что может свидетельствовать о защитной роли Bcl-xL в этой структуре против гипертрофии надпочечников. Механизм связи между снижением экспрессии Bcl-xL, стрессорного уровня кортикостерона и усилением депрессивно-подобного поведения может включать изменение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (ГР). Являясь важнейшими транскрипционными факторами, они значительно увеличивают ядерную транслокацию в клетках мозга при остром стрессе [38, 39], а во фронтальной коре в разные сроки, через 20 [40] и 40 минут [41], после стресса принудительного плавания обнаружено увеличение уровней мРНК и белка ГР. Глюкокортикоиды могут влиять на

экспрессию антиапоптозных белков [42, 43], образование комплексов между этими белками и ГР, а также их перемещение в митохондрии, усиливая активные пути преодоления стресса в ответ на негативные стимулы [44, 45]. В последнее время в литературе появляется все больше данных, связывающих митохондриальную дисфункцию с патофизиологией депрессии [46].

Информативным маркером нейрональной пластичности, ассоциируемым с депрессивным фенотипом, считают экспрессию BDNF [47]. Однако, в отличие от обычно сниженной, согласно нейротрофической гипотезе депрессии [48], экспрессии нейротрофина в различных животных моделях этой патологии [49], экспрессия BDNF в гиппокампе после подавления Vcl-xL, несмотря на продепрессантный поведенческий эффект, была повышенной. Такое несоответствие поведения и экспрессии BDNF в ключевых отделах мозга, связанных с контролем депрессивно-подобного поведения, наблюдается нередко. Например, повышенный уровень экспрессии нейротрофина был обнаружен во фронтальной коре крыс, проявляющих большую продолжительность пассивного поведения в тесте принудительного плавания по сравнению с крысами, проявляющими меньшую продолжительность [50]. Следует отметить, что существенной особенностью головного мозга, обеспечивающей адекватные поведенческие ответы на негативные стимулы, является его пластичность, согласованное функционирование ключевых компонентов и механизмов которой в гиппокампе осуществляется с участием глюкокортикоидных гормонов [51]. Повышение уровня BDNF в гиппокампе в нашей работе может объясняться сниженным уровнем кортикостерона, оказывающего угнетающее влияние на экспрессию BDNF [52]. Повышение экспрессии BDNF в гиппокампе могло быть также компенсаторным ответом на снижение экспрессии Vcl-xL. Функционирование нейротрофической и анти-апоптозной систем взаимосвязано, на что указывает повышающее влияние BDNF на экспрессию Vcl-xL в гиппокампе [53].

Активную роль в провоцировании депрессивно-подобного поведения играют воспалительные процессы [54], которые в условиях нашего эксперимента могли быть вызваны, например, инъекцией вирусных векторов в мозг [55] или стрессовыми условиями теста принудительного плавания. Даже такое небольшое стрессовое воздействие, как 30-минутное ограничение подвижности, повышало в плазме крови крыс уровень, по крайней мере, одного провоспалительного цитокина – интерлейкина-6 [56]. Клинические исследования показывают прямую взаимосвязь между уровнем интерлейкина-6 в периферической крови и тяжестью депрессии [57]. Однако в нашей работе не было обнаружено значительных различий между

группами по уровню интерлейкина-6 в периферической циркуляции, что отвергает возможность существенного вклада периферического воспаления в изменение поведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение экспрессии Vcl-xL в гиппокампе и фронтальной коре сопровождалось у крыс депрессивно-подобным ответом в тесте принудительного плавания. Этому поведенческому эффекту сопутствовало изменение функционирования надпочечников, проявляющееся увеличением веса желез и снижением стрессорного уровня кортикостерона в плазме крови.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность замечательным квалифицированным помощникам в проведении экспериментальных исследований, сборе материала и его последующей обработке Краснопеевой Ларисе Александровне и Рябчиковой Ирине Алексеевне.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана бюджетным проектом № FWR-2022-0023.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией данной рукописи.

Этическое одобрение. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, рекомендациям биоэтической комиссии Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2012 г.), а также директивам Совета Европы (86/609/ЕЕС).

Информированное согласие. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dygalo N.N., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Shishkina G.T. // Cell. Mol. Neurobiol. 2012. V. 32. P. 767–776.
2. McEwen B.S. // Metabolism. 2005. V. 54. P. 20–23.
3. Lucassen P.J., Pruessner J., Sousa N., Almeida O.F., Van Dam A.M., Rajkowska G., Swaab D.F., Czéh B. // Acta Neuropathol. 2014. V. 127. P. 109–135.
4. Nestler E.J., Russo S.J. // Neuron. 2024. V. 112(12). P. 1911–1929.

5. *Lucassen P.J., Vollmann-Honsdorf G.K., Gleisberg M., Czéh B., De Kloet E.R., Fuchs E.* // *Eur. J. Neurosci.* 2001. V. 14(1). P. 161–166.
6. *Lucassen P.J., Heine V.M., Muller M.B., van der Beek E.M., Wiegant V.M., De Kloet E.R., Joels M., Fuchs E., Swaab D.F., Czeh B.* // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2006. V. 5. P. 531–546.
7. *Kubera M., Obuchowicz E., Goehler L., Brzeszcz J., Maes M.* // *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2011. V. 35. P. 744–759.
8. *Culig L., Surget A., Bourdey M., Khemissi W., Le Guisquet A.M., Vogel E., Sahay A., Hen R., Belzung C.* // *Neuropharmacology.* 2017. V. 126. P. 179–189.
9. *Planchez B., Surget A., Belzung C.* // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2020. V. 50. P. 88–95.
10. *Jones K.L., Zhou M., Jhaveri D.J.* // *NPJ Sci. Learn.* 2022. V. 7. P. 16.
11. *Murray F., Hutson P.H.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2007. V. 569. P. 41–47.
12. *Kosten T.A., Galloway M.P., Duman R.S., Russell D.S., D'Sa C.* // *Neuropsychopharmacology.* 2008. V. 33. P. 545–558.
13. *Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Bulygina V.V., Dygalo N.N.* // *Behav. Brain Res.* 2010. V. 213. P. 218–224.
14. *Malkesman O., Austin D.R., Tragon T., Henter I.D., Reed J.C., Pellecchia M., Chen G., Manji H.K.* // *Mol. Psychiatry.* 2012. V. 17. P. 770–780.
15. *Wang Y., Xiao Z., Liu X., Berk M.* // *Hum. Psychopharmacol.* 2011. V. 26(2). P. 95–101.
16. *Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Dygalo N.N.* // *Neuropharmacology.* 2012. V. 62. P. 177–183.
17. *Engel D., Zomkowski A.D., Lieberknecht V., Rodrigues A.L., Gabilan N.H.* // *J. Psychiatr. Res.* 2013. V. 47. P. 802–808.
18. *Dygalo N.N., Bannova A.V., Sukhareva E.V., Shishkina G.T., Ayriyants K.A., Kalinina T.S.* // *Biochemistry (Mosc).* 2017. V. 82. P. 345–350.
19. *De-Paula V.J., Dos Santos C.C.C., Luque M.C.A., Ali T.M., Kalil J.E., Forlenza O.V., Cunha-Neto E.* // *Metab. Brain Dis.* 2021. V. 36. P. 193–197.
20. *González-García M., García I., Ding L., O'Shea S., Boise L.H., Thompson C.B., Núñez G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 4304–4308.
21. *Jonas E.A., Porter G.A., Alavian K.N.* // *Front. Physiol.* 2014. V. 5. P. 355.
22. *Szulc J., Wiznerowicz M., Sauvain M.O., Trono D., Aebischer P.* // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. P. 109–116.
23. *Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M.* // *Nature.* 1977. V. 266. P. 730–732.
24. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.* // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 47. P. 379–391.
25. *Bannova A.V., Menshanov P.N., Dygalo N.N.* // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. P. 344–348.
26. *Castagné V., Porsolt R.D., Moser P.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2009. V. 616. P. 128–133.
27. *Ge C., Wang S., Wu X., Lei L.* // *Behav. Brain Res.* 2024. V. 465. P. 114934.
28. *Nakamura A., Swahari V., Plestant C., Smith I., McCoy E., Smith S., Moy S.S., Anton E.S., Deshmukh M.* // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. P. 5448–5461.
29. *Ma K., Zhang Z., Chang R., Cheng H., Mu C., Zhao T., Chen L., Zhang C., Luo Q., Lin J., Zhu Y., Chen Q.* // *Cell Death Differ.* 2020. V. 27. P. 1036–1051.
30. *Cui W., Chen C., Gong L., Wen J., Yang S., Zheng M., Gao B., You J., Lin X., Hao Y., Chen Z., Wu Z., Gao L., Tang J., Yuan Z., Sun X., Jing L., Wen G.* // *CNS Neurosci. Ther.* 2024. V. 30. P. e14377.
31. *Li M., Wang D., He J., Chen L., Li H.* // *Pharmacol Res.* 2020. V. 151. P. 104547.
32. *Park H.A., Licznarski P., Alavian K.N., Shanabrough M., Jonas E.A.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. V. 22. P. 93–108.
33. *Jansen J., Scott M., Amjad E., Stumpf A., Lackey K.H., Caldwell K.A., Park H.A.* // *Biology (Basel).* 2021. V. 10. P. 772.
34. *Jonas E.A., Hoit D., Hickman J.A., Brandt T.A., Polster B.M., Fannjiang Y., McCarthy E., Montanez M.K., Hardwick J.M., Kaczmarek L.K.* // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 8423–8431.
35. *Li H., Chen Y., Jones A.F., Sanger R.H., Collis L.P., Flannery R., McNay E.C., Yu T., Schwarzenbacher R., Bossy B., Bossy-Wetzel E., Bennett M.V., Pypaert M., Hickman J.A., Smith P.J., Hardwick J.M., Jonas E.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 2169–2174.
36. *Bas J., Nguyen T., Gillet G.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 3202.
37. *Stone E.A., Lin Y.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2008. V. 580. P. 135–142.
38. *Noguchi T., Makino S., Matsumoto R., Nakayama S., Nishiyama M., Terada Y., Hashimoto K.* // *Endocrinology.* 2010. V. 151. P. 4344–4355.
39. *Caudal D., Jay T.M., Godsil B.P.* // *Front. Behav. Neurosci.* 2014. V. 8. P. 19.
40. *Karandrea D., Kittas C., Kitraki E.* // *Neuroendocrinology.* 2002. V. 75. P. 217–226.
41. *Shishkina G.T., Bulygina V.V., Dygalo N.N.* // *Psychopharmacology (Berl).* 2015. V. 232. P. 51–60.
42. *Gascoyne D.M., Kypta R.M., Vivanco d. M.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 18022–18029.
43. *Viegas L.R., Vicent G.P., Baraňao J.L., Beato M., Pecci A.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 9831–9839.
44. *Du J., McEwen B., Manji H.K.* // *Commun. Integr. Biol.* 2009. V. 2(4). P. 350–352.

45. *Drakulić D., Veličković N., Stanojlović M., Grković I., Mitrović N., Lavrnja I., Horvat A.* // *J. Neuroendocrinol.* 2013. V. 25. P. 605–616.
46. *Khan M., Baussan Y., Hebert-Chatelain E.* // *Biomolecules.* 2023. V. 13. P. 695.
47. *Chakrapani S., Eskander N., De Los Santos L.A., Omisore B.A., Mostafa J.A.* // *Cureus.* 2020. V. 12. P. e11396.
48. *Duman R.S., Monteggia L.M.* // *Biol. Psychiatry.* 2006. V. 59(12). P. 1116–1127.
49. *Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N.* // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 932757.
50. *Stepanichev M., Manolova A., Peregud D., Onufriev M., Freiman S., Aniol V., Moiseeva Y., Novikova M., Lazareva N., Gulyaeva N.* // *Neuroscience.* 2018. V. 375. P. 49–61.
51. *Gulyaeva N.V.* // *Biochemistry (Mosc).* 2023. V. 88. P. 565–589.
52. *Schaaf M.J., De Kloet E.R., Vreugdenhil E.* // *Stress.* 2000. V. 3. P. 201–208.
53. *Chao C.C., Ma Y.L., Lee E.H.* // *Brain Pathol.* 2011. V. 21. P. 150–162.
54. *Kim Y.K., Na K.S., Myint A.M., Leonard B.E.* // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2016. V. 64. P. 277–284.
55. *Martianova E., Aniol V.A., Manolova A.O., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V.* // *Acta Histochem.* 2019. V. 121. P. 368–375.
56. *Serrats J., Grigoleit J.S., Alvarez-Salas E., Sawchenko P.E.* // *Brain Behav. Immun.* 2017. V. 62. P. 53–63.
57. *Min X., Wang G., Cui Y., Meng P., Hu X., Liu S., Wang Y.* // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1110775.

A Reduced Expression of BCL-XL in the Hippocampus is Accompanied by a Depression-Like Phenotype in Rats

G. T. Shishkina¹, D. A. Lanshakov¹, A. V. Bannova¹, N. P. Komysheva¹, and N. N. Dygalo¹

¹*The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

The previously identified ability of the anti-apoptotic protein Bcl-xL to increase expression in the hippocampus in response to stress, which correlated with resistance to stress-induced depression (Shishkina et al., 2010; Dygalo et al., 2012), indicates the potential use of this protein as a target for reducing symptoms of depressive disorder. The aim of this work was to evaluate in rats the effect of suppression of Bcl-xL expression in the hippocampus (using a TET-ON system based on lentiviral vectors for doxycycline-controlled transgene expression) on behavior in the forced swim test. The detected decrease in the expression (determined by immunoblotting) of Bcl-xL in the hippocampus and less pronounced in the frontal cortex was accompanied by a clear depressive-like effect, manifested by a shorter latency period before the first episode of freezing and a longer duration of passive behavior. Animals that received joint administration of the vector and doxycycline also showed a significant increase in the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein in the hippocampus, the relative weight of the adrenal glands, and a decrease in the stress level of corticosterone in the blood plasma compared to groups that received separate administrations of these drugs. Relative adrenal weights were significantly negatively correlated with Bcl-xL expression levels in the frontal cortex. Overall, gene-directed reduction of Bcl-xL expression in the hippocampus resulted in a depressive-like response in the forced swim test in rats. This behavioral effect was accompanied by a change in the functioning of the adrenal glands, manifested by an increase in the weight of the glands and a decrease in the stress level of corticosterone in the peripheral circulation.

Keywords: anti-apoptotic protein Bcl-xL, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), hippocampus, frontal cortex, forced swim test, corticosterone, adrenal glands

ДЕКСАМЕТАЗОН СНИЖАЕТ УРОВНИ мРНК ЦИТОКИНОВ И АКТИВНОСТЬ МИКРОГЛИИ В СТВОЛЕ МОЗГА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС

© 2024 г. Т. С. Калинина^{1, 2, *}, В. В. Булыгина¹, Д. А. Ланшаков^{1, 2}, Е. В. Сухарева¹,
Н. Н. Дыгало^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 11.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

Микроглия в перинатальный период онтогенеза выполняет функции критически важного регулятора процессов ангио-, нейро- и синаптогенеза. В условиях нормального развития, без индукции воспаления, введение глюкокортикоидного гормона – дексаметазона (0.2 мг/кг) вызывало быстрое снижение уровней мРНК как про-, так и противовоспалительных цитокинов в стволе мозга новорожденных крысят. Уменьшение экспрессии генов *Il1b*, *Tnfa* наблюдалось уже через 1 час, а *Il10*, *Tgfb1* через 4 часа после введения гормона 3-суточным крысятам. Подавление уровней мРНК цитокинов сопровождалось уменьшением числа клеток, экспрессирующих маркерный белок микроглии IBA1 в области голубого пятна ствола мозга, к 6 часу после введения глюкокортикоида. Выявленное в работе снижение экспрессии цитокинов и активности микроглии способно нарушить участие микроглии в процессах нейропластичности развивающегося мозга, что может являться одной из причин долговременного изменения его функционирования.

Ключевые слова: дексаметазон, цитокины, микроглия, мРНК, неонатальный мозг, ранние воздействия

DOI: 10.31857/S1027813324030039, EDN: EQUVXL

ВВЕДЕНИЕ

При развитии воспаления введение синтетического глюкокортикоида – дексаметазона подавляет экспрессию провоспалительных и стимулирует экспрессию противовоспалительных цитокинов, что оказывает иммуносупрессивный эффект [1–3]. Способность гормона снижать воспаление успешно используется в клинике. Вместе с тем, действие дексаметазона на экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов в условиях нормального развития, а не стимулированного воспаления, остается открытым. Применение глюкокортикоидов в перинатальной медицине для купирования респираторного дистресс-синдрома новорожденных при угрозе преждевременных родов [4–6] делает вопрос о влиянии гормона на экспрессию цитокинов развивающегося мозга актуальным. Благодаря своей липофильной природе и незрелости гематоэнцефалического барьера, дексаметазон легко проникает в мозг, где основным “иммунным органом” является микроглия. Основные функции

микроглии перинатального мозга включают в себя не только очищение клеток от продуктов физиологического апоптоза и борьбу с патогенами, но и, что более важно, участие в образовании корректных и функциональных синаптических контактов формирующихся нейронных сетей [7–9]. Следовательно, повышение уровня гормона в критический период развития мозга может изменить активность микроглии и тем самым повлиять на формирование связей между нейронами и организацию нейросетей, меняя функционирование мозга в дальнейшем. Известно, что стимуляция активности микроглии в раннем онтогенезе меняет у взрослых животных стресс-реактивность, иммунный ответ, увеличивает склонность к психопатологиям [10–13]. С целью выяснения влияния дексаметазона на уровни мРНК цитокинов в работе определяли динамику быстрых изменений уровней мРНК генов провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1 бета (*Il1b*), фактора некроза опухоли-альфа (*Tnfa*) и анти-воспалительных: интерлейкина 10 (*Il10*) и трансформирующего ростового

фактора бета (*Tgfb1*), а также уровень экспрессии маркерного белка микроглии IBA1 в стволе мозга неонатальных крысят.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные, введение препаратов, забор материала. В работе использовали неонатальных крысят Вистар обоого пола, содержащихся по-пометно вместе с матерями в ЦКП Вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Животных содержали в соответствии с Директивой Европейского Парламента и Совета ЕС 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г., а также приказом 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики” Министерства Здравоохранения РФ, условия содержания были одобрены биоэтической комиссией ИЦиГ СО РАН – Протокол № 19 от 26 ноября 2013 года при свободном доступе к воде и корму, контролируемом световом режиме 14/10. Беременные самки были рассажены в индивидуальные клетки не позднее 18 дня беременности. День родов считали первым днем жизни. На второй день все пометы были выравнены до 8–10 крысят. Для нивелировки материнских эффектов в каждом помете находились животные контрольных и подопытных групп. Число животных было минимизировано до получения статистически достоверных результатов, каждая группа состояла из 10–12 животных, при этом в каждой экспериментальной группе были представлены крысята из не менее чем 3–4 разных пометов.

На 3-й день жизни крысятам вводили подкожно 0.2 мг/кг/20 мкл дексаметазона (KRKA, Словения), физиологический раствор (20 мкл), либо оставляли интактными. После инъекций крысят возвращали к матерям. Животных выводили из эксперимента быстрой декапитацией через 30, 60, 120, 240 и 360 минут после введений препаратов. Все манипуляции проводили в интервале с 09:00 до 15:00. Для определения уровней мРНК ($n = 7-8$) на холоду выделяли ствол мозга, включающий весь блок ткани позади четверохолмия – ростральную часть продолговатого мозга и область моста. Для иммуногистохимического анализа после холодового наркоза проводили транскардиальную перфузию крысят ($n = 4$) 0.02М фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4% раствором параформальдегида в 0.02 М PBS, извлекали мозг и помещали в такой же фиксатор на 4 часа, а затем в 30% сахарозу в 0.02 М PBS для криопротекции.

Определение уровней мРНК. Суммарную РНК из образцов ствола мозга выделяли одностадийным гуанидин-изотиоцианатным методом, как описано нами ранее [14–16]. Синтез кДНК проводили из 3 мкг суммарной РНК с применением Oligo(dT) и ревертазы M-MuLV (“СибЭнзим”, Россия) в течение 90 мин при 42°C. Количественный

анализ уровней мРНК цитокинов относительно мРНК гена домашнего хозяйства бета-актина проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays (*Il1b*: Rn00580432_m1; *Tnfa*: Rn00562055_m1; *Il10*: Rn99999012_m1; *Tgfb1*: Rn00572010_m1; *Actb*: Rn00667869_m1; Thermo Fisher Scientific, USA) на амплификаторе VIIA™7 (Thermo Fisher Scientific, USA) в соответствии с протоколом производителя и рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$.

Иммуногистохимия. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на сагиттальных срезах толщиной 20 мкм, собранных на адгезивных стеклах Superfrost plus (Термо, США). Неспецифическое связывание блокировали в 1.5% BSA в PBST (0.02М PBS с 0.2% Triton X-100). Использовали специфичные первичные антитела в разведении 1:250 для маркера микроглии IBA1 (ab178847, Abcam, США, rabbit) и тирозингидроксилазы (TH) (ab1542, Merck Millipore, sheep). Далее срезы инкубировали со вторичными антителами осла против IgG кролика с флуоресцентной меткой (Alexa-568, Biotium) и осла против IgG овцы с флуоресцентной меткой (Alexa-488, Jackson ImmunoResearch), каждое вторичное антитело брали в разведении 1:300.

Микрофотосъемки в области синего пятна ствола мозга (Locus coeruleus, LC) проводили на конфокальном микроскопе LSM 780 (“Carl Zeiss”, Германия). Общий уровень флуоресцентного свечения (для тирозингидроксилазы (TH)), а также средний диаметр по 10 клеткам и количество клеток на 1 мм² среза мозга, экспрессирующих IBA1, подсчитывали с помощью программного обеспечения ZEN.

Статистический анализ. После проверки выборок на нормальность распределения по критерию Колмогорова, обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA: двухфакторного для уровней мРНК (независимые факторы: введение гормона и время) или однофакторного для результатов иммуногистохимии (фактор: введение гормона). Апостериорное сравнение групп анализировали по Фишеру, с применением, в случае необходимости, поправки на множественное сравнение (для уровней мРНК генов) или без таковой (для иммуногистохимии) в пакете программ Statistica 10 (StatSoft, США). Результаты представлены как среднее \pm ошибка средней. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение дексаметазона привело к быстрому снижению уровней мРНК генов провоспалительных цитокинов (рис. 1). Уже через 1 час после гормонального воздействия уровень мРНК интерлейкина 1В (*Il1b*) в стволе мозга 3-суточных крысят достоверно снизился (рис. 1а) по сравнению

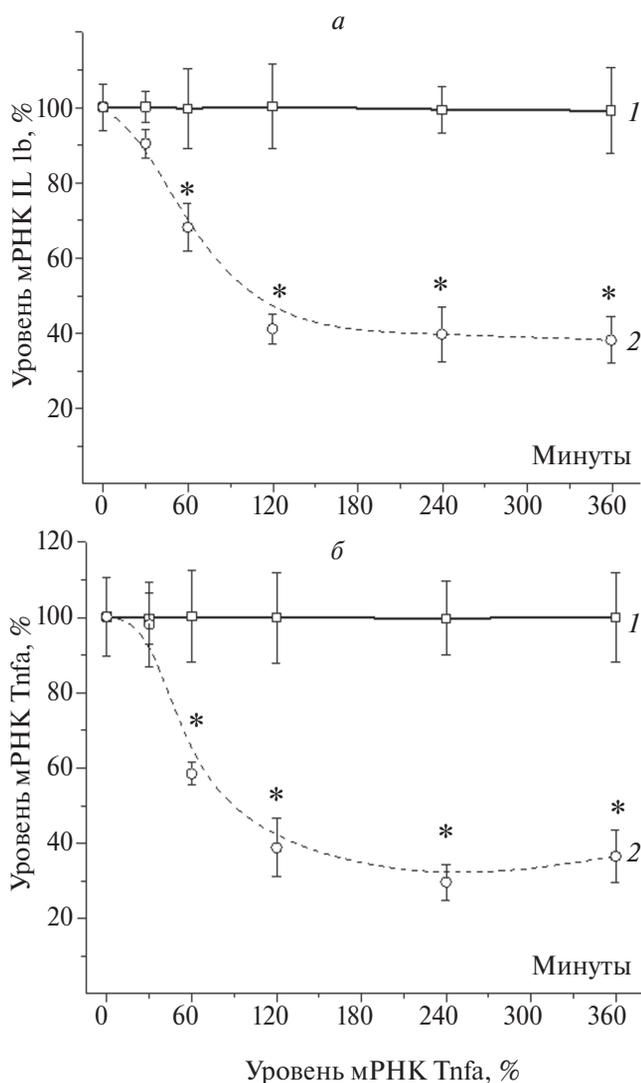


Рис. 1. Уровни мРНК интерлейкина 1В (*Il1b*) (а) и фактора некроза опухоли-альфа (*Tnfa*) (б) в стволе мозга 3-суточных крысят через 30, 60, 120, 240 и 360 минут после введения 0.2 мг/кг дексаметазона (кривая № 2) в процентах от введения физиологического раствора (кривая № 1). “0” по оси абсцисс – интактные одновозрастные крысята, * $p < 0.05$ по сравнению с контрольными животными аналогичного временного интервала.

с уровнем контрольных животных (влияние гормона: $F(1,87)=59.75$, $p < 0.001$; влияние времени $F(5,87)=6.99$, $p < 0.001$; взаимодействие факторов $F(5,87)=6.74$, $p < 0.001$). Аналогичное снижение экспрессии гена обнаружено и для другого провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли-альфа (*Tnfa*) (рис. 1б), уровень мРНК которого также был значимо ниже уровня контрольных животных, начиная с первого часа после введения гормона (влияние гормона $F(1,79)=36.37$, $p < 0.001$; влияние времени $F(5,79)=4.47$, $p < 0.001$;

взаимодействие факторов $F(5,79)=4.43$, $p < 0.001$). Снижение экспрессии генов обоих провоспалительных цитокинов оставалось на низком, относительно контрольных животных, уровне на протяжении всех 6 часов наблюдений.

Уровни мРНК противовоспалительных цитокинов, интерлейкина 10 (*Il10*) и трансформирующего фактора роста бета (*Tgfb*) также снижались под действием гормона, но это действие гормона выявлялось только к 4 и 6 часу после введения дексаметазона (рис. 2): для *Il10* влияние гормона $F(1,66)=10.04$, $p < 0.002$ (рис. 2а), для *Tgfb* $F(1,88)=5.01$, $p < 0.03$ (рис. 2б), соответственно.

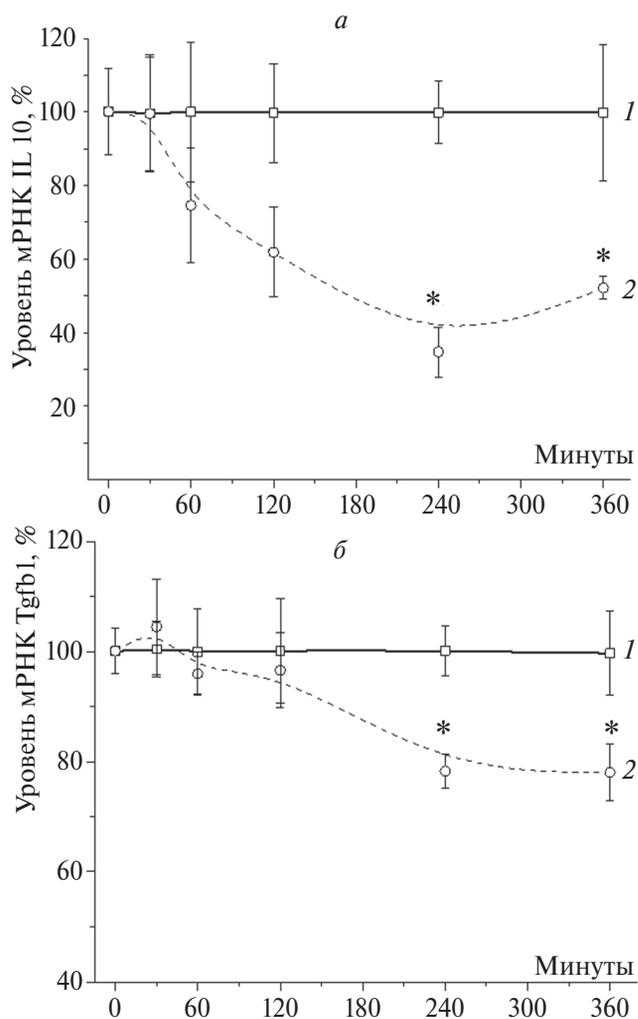


Рис. 2. Уровни мРНК интерлейкина 10 (*Il10*) (а) и трансформирующего фактора роста бета (*Tgfb*) (б) в стволе мозга 3-суточных крысят через 30, 60, 120, 240 и 360 минут после введения 0.2 мг/кг дексаметазона (кривая № 2) в процентах от введения физиологического раствора (кривая № 1). “0” по оси абсцисс – интактные одновозрастные крысята, * $p < 0.05$ по сравнению с контрольными животными аналогичного временного интервала.

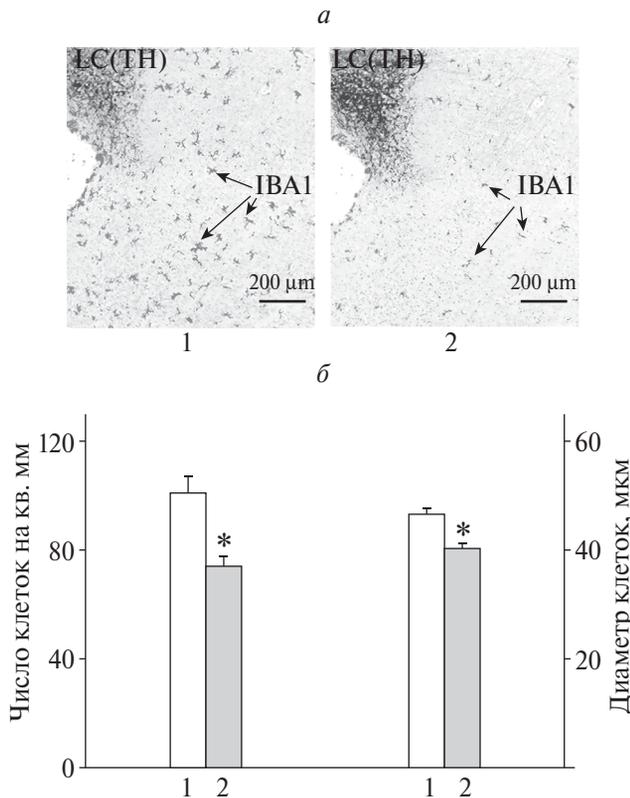


Рис. 3. (а) Репрезентативные микрофотографии окраски IBA1 в стволе мозга 3-суточных крысят контрольной группы (1) и через 6 часов после введения дексаметазона (2). Клетки микроглии отмечены стрелками, LC(TH) – область синего пятна ствола мозга (Locus Coeruleus) с окраской на тирозингидроксилазу (TH).

(б) Число клеток, экспрессирующих IBA1, и их диаметр в стволе мозга контрольных (1) и получивших 0.2 мг/кг дексаметазона (2) 3-суточных крысят через 6 часов после воздействия.

* $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой.

Достоверного влияния времени и взаимодействия факторов на уровни мРНК исследуемых противовоспалительных цитокинов не выявлено.

Снижение экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов сопровождалось уменьшением числа микроглиальных клеток и их диаметра в стволе мозга новорожденных крысят (рис. 3). Через 6 часов после введения дексаметазона число клеток, экспрессирующих маркерный белок активированной микроглии IBA1, уровень которого оценивали иммуногистохимически, был достоверно меньше, чем у животных контрольной группы, получавших инъекцию физиологического раствора $F(1,18)=8.39$, $p<0.01$. Средний диаметр клеток микроглии после введения гормона также достоверно снижался $F(1,18)=5.37$; $p<0.03$. При этом уровень флуоресцентного сигнала для белка ключевого фермента синтеза

катехоламинов – тирозингидроксилазы (TH) в области синего пятна ствола мозга через 6 часов после введения гормона был повышен $F(1,18)=5.22$; $p<0.03$.

Таким образом, введение дексаметазона вызывает быстрое градиентное угнетение экспрессии как про-, так и, в дальнейшем, противовоспалительных цитокинов в стволе мозга неонатальных крысят, снижая к 6 часу после введения число и активность микроглиальных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клетки микроглии в неонатальном мозге выполняют критически важные функции. В условиях нормального развития, без воспаления, именно микроглия участвует в процессах ангиогенеза, удалении избыточного числа нейронов и в синаптогенезе – образовании корректных синаптических контактов, поддерживая формирование функциональных нейронных сетей и удаляя нефункциональные связи между нейронами, тем самым микроглия участвует в формировании нейропластичности ЦНС [7–9]. Поэтому отклонение активности микроглии как в сторону ее увеличения при индукции воспаления, так и угнетения, установленного в нашей работе при введении глюкокортикоидного гормона, способно оказать долговременное влияние на функционирование мозга и регулируемые им функции.

Повышение уровня глюкокортикоидов в результате стресса или гормональной терапии в чувствительный период раннего онтогенеза, как известно, приводит к перманентным долговременным изменениям – у взрослых животных меняется реакция на стресс, нарушаются нейромедиаторные системы мозга и, соответственно, регуляция многих функций [17–21]. Многочисленные эпидемиологические исследования применения глюкокортикоидов при угрозе преждевременных родов свидетельствуют о неблагоприятных отдаленных последствиях антенатального введения гормонов и у человека [4–6], что вызывает целый ряд метаболических отклонений – от нарушения толерантности к глюкозе и развития гипертонии до выраженных патологий умственного и психоэмоционального развития, нарушению памяти, способности к обучению, вплоть до появления тяжелых тревожно-депрессивных состояний [21–23].

Введение дексаметазона неонатальным крысятам в нашем исследовании вызвало одностороннее действие на уровни мРНК как про-, так и противовоспалительных цитокинов – снижение экспрессии их генов, различное по времени своего проявления. Это угнетение экспрессии по всей видимости не является следствием катаболического действия глюкокортикоидов, тормозящего, как известно, синтез белка [1, 24], поскольку

изменения экспрессии гена домашнего хозяйства в исследуемом временном диапазоне выявлено не было. Молекулярной основой эффектов дексаметазона могут являться как классический вариант его действия через глюкокортикоид-отвечающие элементы промоторов цитокинов, так и неканонический механизм действия гормонов – через AP-1 элементы, имеющиеся в промоторных областях всех исследуемых генов [1, 2].

Если снижение экспрессии генов провоспалительных цитокинов, в нашей работе это интерлейкин-1бета (*Il1b*) и фактор некроза опухоли-альфа (*Tnfa*), введением глюкокортикоидных гормонов хорошо известно и успешно используется в клинике [1–3], то обнаруженное в работе уменьшение уровней мРНК противовоспалительных цитокинов было неожиданным, и этот факт нуждается в дальнейшем исследовании. Продукцентом противовоспалительных белков – цитокина интерлейкина-10 и трансформирующего ростового фактора-бета1, особенно в период перинатального онтогенеза, является преимущественно микроглия [25–27]. Усиление экспрессии интерлейкина 10 на уровне гена и белка активно противодействует развитию нейродегенерации при индукции воспаления [25], а TGFb1 критически важен для созревания и гомеостаза микроглии [27, 28]. Обнаруженное нами снижение уровней мРНК *Il10* и *Tgfb1* к 4 часу после введения дексаметазона в стволе неонатального мозга согласуется с недавно выявленным снижением секреции белковых продуктов этих генов в культуре микроглиальных клеток при действии гормона [29].

Выявленное в работе уменьшение уровней мРНК цитокинов сопровождается снижением активности микроглии, что подтверждается обнаруженным нами уменьшением числа клеток, экспрессирующих маркерный белок IBA1, а также уменьшением среднего диаметра микроглиоцитов. Такое снижение базальной активности микроглии способно ослабить выполнение ею своих функций в неонатальном мозге и явиться причиной нарушения формирования нейронных сетей и функционирования мозга в дальнейшем.

Исследуемый в нашей работе возраст – первые дни постнатального развития – является критически важным периодом онтогенеза. Как было впервые установлено работами нашей лаборатории даже кратковременное снижение экспрессии одного единственного гена – альфа2A-адренорецептора – в этот период развития применением РНК-интерференции или антисенс-нокдауна приводит к значительным изменениям поведения и нейробиологии – значительно снижается уровень тревожности взрослых животных и повышается плотность альфа2-адренорецепторов в отделах мозга взрослых животных [14, 30, 31]. Кроме того, введение дексаметазона крысам на 3 день

постнатального развития вызывает значимое увеличение экспрессии гена и белка ключевого фермента синтеза катехоламинов – тирозингидроксилазы (ТН) [15, 32], сохраняющееся, как минимум, сутки и меняющее активность ТН у взрослых животных в стволе мозга – области локализации перикарионов норадренергических нейронов [32, 33]. В нашей работе мы вновь зафиксировали рост экспрессии белка ТН в области синего пятна ствола мозга через 6 часов после введения гормона. Недавно выявлена отрицательная взаимосвязь между активностью норадренергической системы мозга и микроглией: установлено, что выделение норадреналина нейронами ствола мозга препятствует росту отростков и подвижности микроглиальных клеток, ослабляя нейроиммунные связи [34–37]. Исходя из этого можно полагать, что выявленное в работе снижение экспрессии цитокинов и экспрессии IBA1 может быть связано и с наблюдаемым нами ростом активности норадренергической системы мозга под действием дексаметазона.

В целом, снижение экспрессии исследуемых генов цитокинов и активности микроглии свидетельствует о возможном ослаблении трофической поддержки как незрелых, так и сформированных нейронов, снижению элиминации апоптотических клеток и некорректных синаптических контактов в критический период развития мозга [7, 38, 39], что в совокупности с обнаруженным нами ранее усилением апоптоза нейронов неонатального мозга под действием дексаметазона [16] способно привести к нарушению морфофункциональной структуры формирующегося мозга и явиться причиной долговременного изменения его функционирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Однократное введение глюкокортикоидного гормона – дексаметазона – вызывает быстрое снижение экспрессии генов как про-, так и противовоспалительных цитокинов в стволе мозга новорожденных крысят. Установленное подавление уровней мРНК цитокинов сопровождается угнетением активности микроглиоцитов. Выявленные особенности действия дексаметазона способны ослабить участие микроглии в процессах нейропластичности развивающегося мозга и явиться одной из причин долговременного изменения его функционирования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН ФИЦ ИЦиГ СО РАН (№ FWNR-2022-0023).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все экспериментальные процедуры были проведены в соответствии с международными правилами обращения с животными и одобрены биоэтической комиссией Института.

Информированное согласие. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. // *Endocr. Rev.* 2000. V. 21. P. 55–89.
2. Sorrells S.F., Sapolsky R.M. // *Brain Behav. Immun.* 2007. V. 21. P. 259–272.
3. Manuela Z., Julien P., Elodie B., Olivier B., Jérôme M. // *Curr Neuropharmacol.* 2021. V. 19. P. 2188–2204.
4. Sarid E.B., Stoopler M.L., Morency A.M., Garfinkle J. // *Pediatr. Res.* 2022. V. 92. P. 1225–1239.
5. Melan N., Pradat P., Godbert I., Pastor-Diez B., Basson E., Picaud J.C. // *Eur. J. Pediatr.* 2024. V. 183. P. 677–687.
6. Zheng B., Zheng Y., Hu W., Chen Z. // *Arch. Toxicol.* 2024. V. 98. P. 1975–1990. doi: 10.1007/s00204-024-03733-2. Epub 2024 Apr 6. PMID: 38581585.
7. Тишкина А.О., Степаничев М.Ю., Аниол В.А., Гуляева Н.В. // *Успехи физиологических наук.* 2014. Т. 45. №4. С. 3–18.
8. Thion M.S., Ginhoux F., Garel S. // *Science.* 2018. V. 362. P. 185–189.
9. Zengeler K.E., Lukens J.R. // *Trends in Immunology.* – 2024.
10. Bilbo S.D., Smith S.H., Schwarz J.M. // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2012. V. 7. P. 24–41.
11. Bilbo S.D., Block C.L., Bolton J.L., Hanamsagar R., Tran P.K. // *Exp. Neurol.* 2018. V. 299. P. 241–251.
12. Walker D.J., Spencer K.A. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2018. V. 256. P. 80–88.
13. Wang H., He Y., Sun Z., Ren S., Liu M., Wang G., Yang J. // *J Neuroinflammation.* 2022. V. 19. P. 132.
14. Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. // *Neuroscience.* 2004. V. 129. P. 521–528.
15. Kalinina T.S., Shishkina G.T., Dygalo N.N. // *Neurochem. Res.* 2012. V. 37. P. 811–818.
16. Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. // *Neurobiol. Dis.* 2016. V. 91. P. 1–9.
17. Дыгало Н.Н., Науменко Е.В. // *Докл. АН СССР. Сер. биол.* 1983. Т. 271. № 4. С. 1003.
18. Дыгало Н.Н., Юдин Н.С., Калинина Т.С., Науменко Е.В. // *Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса.* Новосибирск: Наука. 1990. С. 136–148.
19. Kreider M.L., Tate C.A., Cousins M.M., Oliver C.A., Seidler F.J., Slotkin T.A. // *Neuropsychopharmacology.* 2006. V. 31. P. 12–35.
20. Slotkin T.A., Ko A., Seidler F.J. // *Toxicology.* 2018. V. 408. P. 11–21.
21. Tsiarli M.A., Rudine A., Kendall N., Pratt M.O., Krall R., Thiels E., DeFranco D.B., Monaghan A.P. // *Transl. Psychiatry.* 2017. V. 7. e1153
22. O'Donnell K.J., Meaney M.J. // *Am. J. Psychiatry.* 2017. V. 174. P. 319–328. doi: 10.1176/appi.ajp.2016.16020138. Epub 2016 Nov 14. PMID: 27838934.
23. Scheinost D., Sinha R., Cross S.N., Kwon S.H., Sze G., Constable R.T., Ment L.R. // *Pediatr. Res.* 2017. V. 81. P. 214–226.
24. Meyer J.S. // *Physiol. Rev.* 1985. V. 65. P. 946–1020.
25. Park K.W., Lee H.G., Jin B.K., Lee Y.B. // *Exp. Mol. Med.* 2007. V. 39. P. 812–819.
26. Bedolla A., Wegman E., Weed M., Paranjpe A., Alkhimovitch A., Ifergan I., McClain L., Luo Y. // *bioRxiv [Preprint].* 2023. 2023.07.05.547814.
27. Spittau B., Dokalis N., Prinz M. // *Trends Immunol.* 2020. V. 41. P. 836–848.
28. Butovsky O., Jedrychowski M.P., Moore C.S., Cialic R., Lanser A.J., Gabriely G., Koeglsperger T., Dake B., Wu P.M., Doykan C.E., Fanek Z., Liu L., Chen Z., Rothstein J.D., Ransohoff R.M., Gygi S.P., Antel J.P., Weiner H.L. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. P. 131–143.
29. Hui B., Yao X., Zhang L., Zhou Q. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2020. V. 393. P. 1761–1768.
30. Shishkina G.T., Kalinina T.S., Popova N.K., Dygalo N.N. // *Behav. Neurosci.* 2004. V. 118. P. 1285–1292.
31. Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1148. P. 409–414.
32. Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Dygalo N.N. // *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2017. V. 7. P. 226–234.
33. Kalinina T.S., Sukhareva E.V., Bulygina V.V., Lanshakov D.A., Egorova K.V., Dygalo N.N. // *European Neuropsychopharmacology.* 2019. V. 29. P. S166–S167.
34. Liu Y.U., Ying Y., Li Y., Eyo U.B., Chen T., Zheng J., Umpierre A.D., Zhu J., Bosco D.B., Dong H., Wu L.J. // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. P. 1771–1781.

35. Mercan D., Heneka M.T. // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. P. 1745–1746.
36. Stowell R.D., Sipe G.O., Dawes R.P., Batchelor H.N., Lordy K.A., Whitelaw B.S., Stoessel M.B., Bidlack J.M., Brown E., Sur M., Majewska A.K. // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. P. 1782–1792.
37. Zou H.L., Li J., Zhou J.L., Yi X., Cao S. // *Ibrain.* 2021. V. 7. P. 309–317.
38. Cronk J.C., Kipnis J. // *F1000Prime Rep.* 2013. V. 5. P. 53.
39. Barry-Carroll L., Gomez-Nicola D. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2024. V. 25. P. 414–427.

Dexamethasone Reduces Cytokine mRNA Levels and Microglial Activity in the Brainstem of Newborn Rats

T. S. Kalinina^{1,2}, V. V. Bulygina¹, D. A. Lanshakov^{1,2}, E. V. Sukhareva¹,
and N. N. Dygalo^{1,2}

¹ Federal research center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

During the perinatal period of ontogenesis microglia, take part functions as a critical key-regulator of the angio-, neuro- and synaptogenesis processes. Under normal development, without inflammation induction, administration of the glucocorticoid hormone dexamethasone (0.2 mg/kg) caused a rapid decrease in the mRNA levels of both pro- and anti-inflammatory cytokines in the brainstem of neonatal rat pups. A decrease in the expression of the *Il1b*, *Tnfa* genes was observed within 1 hour, and *Il10*, *Tgfb1* 4 hours after the administration of the hormone to 3-day-old rat pups. Suppression of cytokine mRNA levels was accompanied by a decrease in the number of cells expressing the microglia marker protein IBA1 in the locus coeruleus region of the brain stem in 6 hours after glucocorticoid administration. The identified features of the dexamethasone action can weaken the participation of microglia in the processes of neuroplasticity in the developing brain, which may be one of the reasons for long-term changes in brain functioning.

Keywords: dexamethasone, cytokines, microglia, mRNA, neonatal brain, early-life exposure

ЭКСПРЕССИЯ ПРО- И ЗРЕЛОГО МОЗГОВОГО
НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА И БЕЛКА BCL-XL
В ГИППОКАМПЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС
ПРИ ВВЕДЕНИИ ДЕКСАМЕТАЗОНА

© 2024 г. В. В. Булыгина^{1, *}, Т. С. Калинина^{1, 2}, Д. А. Ланшаков^{1, 2},
П. Н. Меньшанов^{2, 3}, Е. В. Сухарева¹, Н. Н. Дыгало^{1, 2}

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 12.07.2024 г.

Принята к публикации 16.07.2024 г.

Благодаря ключевой роли нейротрофинов в развитии мозга и пластичности, вопрос о том, может ли и как предшественник нейротрофического фактора мозга (proBDNF) влиять на активное элиминирование избыточных клеток апоптозом, имеет большое значение. Предполагают, что пронейротрофины избирательно активируют рецептор нейротрофина p75, тем самым запуская проапоптотические сигнальные пути, тогда как зрелый BDNF (matBDNF) оказывает антиапоптотическое действие. Обоснование работы: proBDNF и matBDNF проявляют специфические образцы экспрессии и модифицируют процесс апоптоза в мозге неонатальных крыс при индукции его глюкокортикоидами. В эксперименте исследовали влияние глюкокортикоида дексаметазона (DEX) на уровни мРНК *Bdnf* и ключевой протеазы апоптоза каспазы-3, количество клеток, экспрессирующих активную каспазу-3, а также содержание белков proBDNF, matBDNF и ключевого антиапоптозного белка Bcl-xL в гиппокампе 3–4 дневных крыс через 6 или 24 ч после введения DEX. Через 6 ч DEX индуцировал антиапоптотические процессы, а именно – повышал уровни мРНК *Bdnf* в целом гиппокампе, а также содержание белков matBDNF и Bcl-xL в полях CA1-3 и зубчатой извилине структуры. При этом формировалось временное преобладание экспрессии matBDNF над апоптогенным proBDNF на фоне неизменного количества клеток, экспрессирующих активную каспазу-3. Через 24 ч DEX спровоцировал увеличение экспрессии апоптогенного proBDNF, и его превалирование над зрелым нейротрофином во всех полях гиппокампа, сопровождавшееся увеличением количества клеток с детектируемой активной каспазой-3. Более того, нами выявлена достоверная корреляция между соотношением proBDNF/matBDNF и активной каспазой-3 во всех трех областях гиппокампа. Показано, что при индукции дексаметазоном proBDNF имеет свой собственный, отличный от его зрелой формы, паттерн экспрессии в гиппокампе неонатальных крыс, и проявление его проапоптотического действия сопровождается повышением соотношения proBDNF/matBDNF.

Ключевые слова: *proBDNF, matBDNF, Bcl-xL, активная каспаза-3, гиппокамп, дексаметазон*

DOI: 10.31857/S1027813324030044, **EDN:** EQSTWL

ВВЕДЕНИЕ

При развитии респираторного дистресс-синдрома новорожденных широко используется в медицинской практике глюкокортикоидная терапия [1]. Головной мозг в эти сроки наиболее чувствителен к повреждающим воздействиям, в том

числе к повышенному уровню глюкокортикоидов, которые нередко приводят к серьезным и долгосрочным нарушениям физиологических функций организма и поведения [2, 3], механизмы возникновения которых во многом остаются неясными. Нейроны неонатального гиппокампа могут

подвергаться повреждающему воздействию избытка глюкокортикоидных гормонов, поскольку в этой структуре уже в перинатальном периоде наблюдается высокая экспрессия глюкокортикоидных рецепторов [4]. Спектр генов, экспрессия которых может изменяться под влиянием глюкокортикоидов, очень широк и среди них и ключевые гены апоптозного каскада [5, 6], и регуляторы нейропластичности, в частности, BDNF [7–10]. Нейротрофические факторы играют одну из ключевых ролей в процессе формирования головного мозга в ходе неонатального онтогенеза [11], экспрессия BDNF особенно высока в гиппокампе [12]. Было установлено, что незрелые формы белков нейропластичности могут избегать внутриклеточного процессинга и секретироваться из нейронов [13–14]. Кроме того, многие исследователи сходятся во мнении, что все пронеуротрофины выполняют проапоптозную функцию, и proBDNF, в том числе, через свою высокую аффинность к рецепторам p75NTR может провоцировать усиление процесса программируемой гибели клеток [15–18]. А поскольку экспрессия p75NTR имеет свой определенный онтогенетический паттерн, с высокой степенью проявления в неонатальном периоде и последующим спадом [19–20], то роль незрелых форм белков нейропластичности в регуляции программируемой гибели клеток становится весомой именно в раннем онтогенезе. Так, в нашей лаборатории было показано, что в коре неонатальных крыс именно proBDNF является превалирующим продуктом гена *Bdnf* и его уровень положительно коррелирует с уровнем активной каспазы-3 [21]. Важен и баланс незрелых и зрелых форм белков регуляторов нейропластичности, поскольку показано, что зрелые нейротрофины проявляют антиапоптозную активность – matBDNF блокирует ключевой для физиологического апоптоза клеток формирующегося мозга каспазо-3-зависимый путь клеточной гибели [22]. Так как на сегодняшний день известно, что пронеуротрофины способны индуцировать апоптоз даже в присутствии трофической поддержки зрелых нейротрофических факторов [23], результаты одновременного действия зрелых нейротрофинов и их проформ могут быть оценены по интенсивности экспрессии молекулярного маркера апоптоза. Одним из ключевых маркеров заключительной стадии апоптоза является эффекторный белок программируемой клеточной гибели – активная каспаза-3 [24]. Образование активной каспазы-3 из прокаспазы-3 негативно регулируется matBDNF [25] и позитивно – proBDNF [22]. Кроме того, показано, что matBDNF при введении в гиппокамп индуцирует экспрессию другого ключевого антиапоптозного белка Bcl-xL [26]. Целью нашей работы стало изучение изменений уровня matBDNF, proBDNF и значимых белков апоптоза Bcl-xL и каспазы-3, а также выявление параллельной динамики этих молекул в ключевых полях

незрелого гиппокампа (CA1, CA3, зубчатая извилина) трехдневных крысят после кратковременного воздействия селективным агонистом глюкокортикоидных рецепторов дексаметазоном.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и введение гормона. Исследования проводили на крысах Вистар. Крыс содержали в условиях свободного доступа к воде и корму в виварии ИЦиГ СО РАН и следовали рекомендациям о гуманном обращении с лабораторными животными Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 19 от 26.11.2013 г.) в соответствии с Директивой Европейского Парламента и Совета ЕС 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. и “Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных” и согласно приказу Минздрава России № 267 от 19 июня 2003 г. Беременных самок за 3–4 дня до родов рассаживали в индивидуальные клетки. День родов считали первыми сутками жизни. Крысятам обоего пола на 3-й день жизни подкожно вводили дексаметазон (DEX) (KRKA, Словения, 0,2 мг/кг в объеме 20 мкл) либо физиологический раствор (физ. раствор). Доза гормона в настоящем исследовании эквивалентна 12 мг дексаметазона в день для человека весом 60 кг, что имитирует клиническую дозу для беременной женщины (0,2 мг/кг) [27] и соответствует дозе, применяемой нами ранее и способной модифицировать процесс апоптоза в мозжечке в этот период онтогенеза [28]. Животных забивали через 6 и 24 часа после введения дексаметазона. Временные точки определяли, исходя из предыдущих данных [29, 30] и данных литературы [9, 31], ориентируясь на выявленные в этих работах изменения экспрессии ключевых нейротрофических факторов в гиппокампе в ответ на введение глюкокортикоидов.

Анализ уровня мРНК *Bdnf* и каспазы-3 методом ОТ-ПЦР. Суммарную РНК из гиппокампа 7–8 крысят каждой группы выделяли, применяя одностадийный гуанидин-изоцианатный метод, как описано ранее [27]. Для получения кДНК брали 3 мкг суммарной РНК, Oligo(dT) праймер и ревертазу MuLV (“СибЭнзим”, Россия) и инкубировали в условиях стандартной методики (90 мин при 42°C). Количественный анализ содержания мРНК генов *Bdnf* и каспазы-3 относительно мРНК *actb* проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays на амплификаторе ABI ViiA™ 7 (“Applied Biosystems”, США) и рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$.

Иммуногистохимия. Белки proBDNF, matBDNF, Bcl-xL и активной каспазы-3 определяли методом иммуногистохимии [31] с использованием флуоресцентно меченных вторичных антител. После

глубокого холодового наркоза крысят транскардиально перфузировали 0.02 М фосфатным буфером (PBS) и последовательно 4% раствором параформальдегида в 0.02 М PBS. Использовали специфичные к незрелому нейротрофическому фактору proBDNF первичные антитела цыпленка (AB78367 Abscam, Великобритания), специфичные к зрелому нейротрофическому фактору matBDNF первичные мышинные антитела (ABGF35L Merck Millipore, Соединенные Штаты), специфичные к Vcl-xL первичные кроличьи антитела (AB2764, 54H6, Cell Signaling, Соединенные Штаты), специфичные к активной каспазе-3 первичные кроличьи антитела (AB2764, 5A1E, Cell Signaling, Соединенные Штаты), в разведении 1:200. Проводили двойное иммуногистохимическое окрашивание. На одних срезах мозга в качестве первичных антител применяли антитела к matBDNF и Vcl-xL, на других срезах мозга – антитела к proBDNF и активной каспазе-3. Далее срезы инкубировали соответственно со вторичными антителами козы против IgG кролика с флуоресцентной меткой (Alexa-488, A-11008, Invitrogen, Соединенные Штаты) и со вторичными антителами козы против IgG мыши с флуоресцентной меткой (Alexa-594, 115-515-207, Jackson Immuno, Соединенные Штаты) для пары первичных антител к matBDNF и Vcl-xL и со вторичными антителами осла против IgG кролика с флуоресцентной меткой (Alexa-488, 711-545-152, Jackson Immuno, Соединенные Штаты) и со вторичными антителами осла против IgG цыпленка с флуоресцентной меткой (DyLight-594, 703-515-155, Jackson Immuno, Соединенные Штаты) для пары первичных антител к proBDNF и активной каспазе-3 в разведении 1:400. Уровни proBDNF, matBDNF, Vcl-xL и активной каспазы-3 оценивали на коронарных срезах мозга по величине оптической плотности клеток на цифровых фотографиях (увеличение $\times 200$) на 4–5 полях зрения от 4–5-х животных каждой группы. Цифровые фотографии срезов гиппокампа были получены на лазерном сканирующем микроскопе LSM-780. При панорамной съемке срезов для последующей статобработки использовали увеличение $20\times$ и безиммерсионный объектив Plan-Apochromat $20\times/0,8$ M27. По меньшей мере по 6 срезов от каждой крысы было сфотографировано и проанализировано. Данные по относительной оптической плотности флуоресцентного сигнала были обработаны с помощью программного обеспечения ZEN (2011, SP2). Уровни proBDNF и matBDNF и соотношения уровней proBDNF к matBDNF рассчитывали в абсолютных цифрах иммуногистохимических данных, потом для контрольной группы принимали получившееся среднее за 100% и далее данные опытной группы рассчитывали в процентах относительно группы с введением физиологического раствора. Количество клеток, экспрессирующих активную каспазу-3, подсчитывали вручную

на микрофотографиях и определяли их абсолютное количество в поле зрения панорамы гиппокампа для каждого из полей этой структуры, проанализировав минимум 6 срезов от каждой крысы.

Статистический анализ. Данные проверили на соответствие нормальному распределению и применили факторный дисперсионный анализ (ANOVA) (пакет программ JASP (ver. 18.3; Университет Амстердама, 2024)), независимыми факторами которого являлись введение дексаметазона (DEX) и время после введения препарата, фактором повторных измерений выступали поля гиппокампа, с последующим апостериорным анализом межгрупповых различий по критерию Фишера LSD, различия с $p < 0.05$ считали достоверными. Выявление наиболее вероятных моделей дисперсионного анализа проводили с использованием байесовского моделирования ANOVA, на основании значений фактора V_{10} . Уровень сопряженности показателей оценивали корреляционным коэффициентом Спирмана. При необходимости результаты анализа обрабатывали с учетом поправок на множественное сравнение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После воздействия дексаметазоном, уровни зрелой и проформы BDNF демонстрировали специфичную динамику, которая, вместе с тем, была однотипна во всех исследованных полях гиппокампа (рис. 1 и 2). Согласно байесовскому моделированию, изменения уровней форм BDNF и их соотношения лучше всего описывала модель дисперсионного анализа с взаимодействием факторов (DEX + время + DEX*время; V_{10} (matBDNF)=632; V_{10} (proBDNF)=3.1; V_{10} (proBDNF/matBDNF)=37).

Первым в полях гиппокампа, спустя 6 часов после введения дексаметазона наблюдали кратковременный полуторакратный рост уровня зрелой формы matBDNF, который возвращался к исходному через 24 часа после воздействия (рис. 1; Факторы DEX*время - $F(1, 12)=36.23$, $p=0.00006$, $\eta^2=0.75$; Фактор DEX - $F(1, 12)=20.73$, $p=0.0007$, $\eta^2=0.63$).

В отличие от matBDNF, уровни proBDNF через 6 часов после воздействия были сопоставимы между контрольными и получавшими дексаметазон группами (рис. 2). Затем, спустя 24 часа после воздействия уровни proBDNF росли во всех полях гиппокампа на фоне восстановления уровней зрелой формы matBDNF (рис. 1; Факторы DEX*время - $F(1, 12)=6.60$, $p=0.025$, $\eta^2=0.35$; Фактор DEX - $F(1, 12)=1.43$, $p=0.25$, $\eta^2=0.11$).

Как следствие, асинхронная динамика уровней форм BDNF первоначально приводила к падению соотношения proBDNF/matBDNF через 6 часов после воздействия в пользу антиапоптозной зрелой формы нейротрофа, а затем – к росту данного

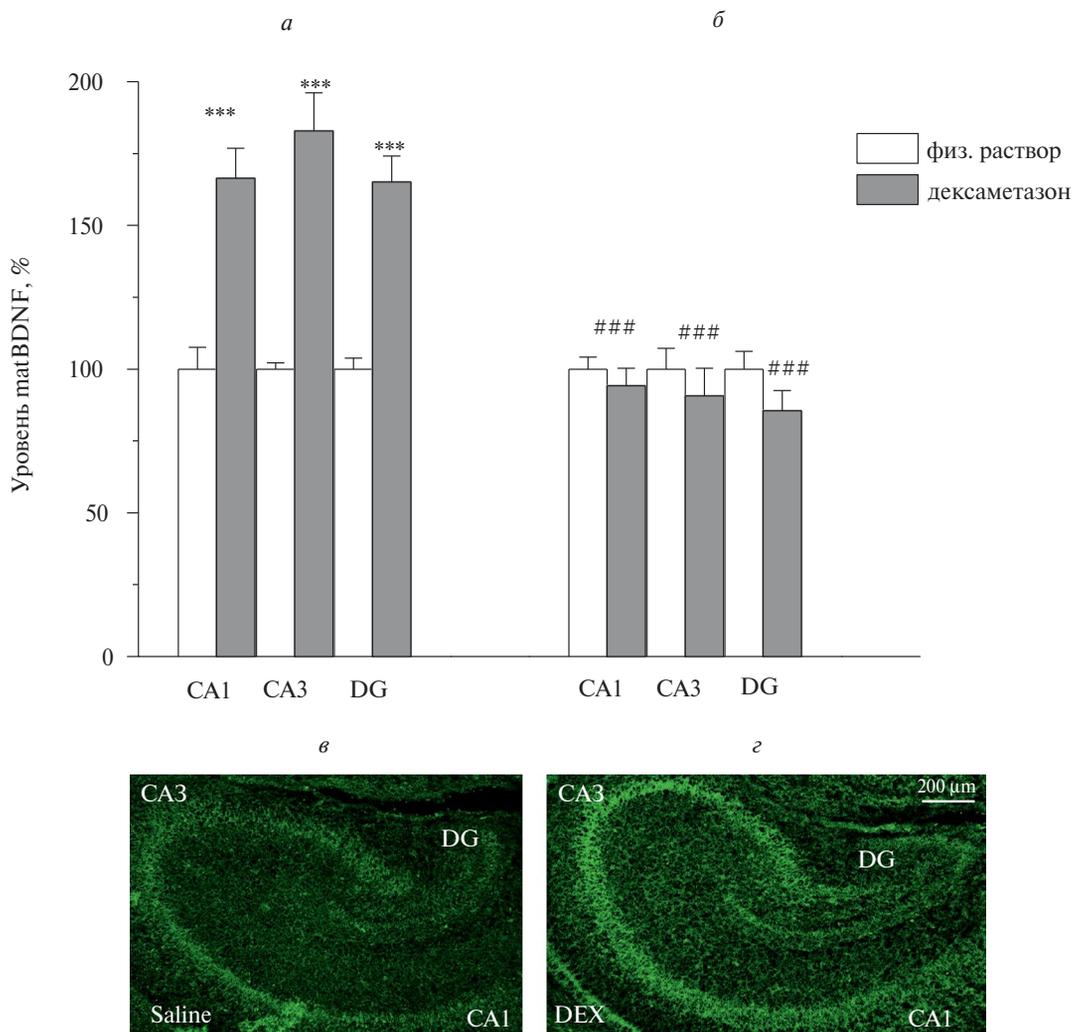


Рис. 1. Уровень BDNF в областях гиппокампа неонатальных крысят через 6 часов (*a*) и 24 часа (*б*) после введения дексаметазона в процентах относительно группы с введением физиологического раствора. *** $p < 0.001$ по сравнению с введением физ. раствора, ### $p < 0.001$ по сравнению с соответствующими 6-часовыми группами. Репрезентативные микрофотографии: белок matBDNF – зеленый сигнал (флуорофор Alexa-488) (*в* – через 6 часов после введения физраствора, *з* – через 6 часов после введения дексаметазона).

соотношения во всех исследованных полях гиппокампа спустя 24 часа в пользу проапоптотной формы BDNF (рис. 3; Факторы DEX*время – $F(1, 12)=17.43$, $p=0.0013$, $\eta^2=0.59$; Фактор DEX – $F(1, 12)=0.01$, $p=0.93$, $\eta^2=0.0006$).

Вызванные введением дексаметазона изменения синтеза различных форм мозгового нейротрофического фактора сопровождались модификацией и процесса транскрипции этого нейротрофа. Достоверный, повышающий уровень мРНК *Bdnf*, проявлялся в гиппокампе через 6 часов после гормонального воздействия и оставался статистически значимым вплоть до 24 часов после введения дексаметазона ($F(1, 17)=7.35$; $p<0.001$). Уровень мРНК каспазы-3 в гиппокампе не изменился ни через 6 часов ($F(1, 17)=0.40$; $p=0.55$), ни

через 24 часа ($F(1, 16)=0.15$; $p=0.70$) после инъекции глюкокортикоида.

Дексаметазон модифицировал не только уровни нейротрофа, но и связанные напрямую с апоптозом показатели – уровни антиапоптотного белка Bcl-xL и число каспаза-3-позитивных клеток. Согласно байесовскому моделированию, изменения уровней форм Bcl-xL и числа каспаза-3-позитивных клеток также лучше всего описывала модель дисперсионного анализа с взаимодействием факторов (DEX + время + DEX*время; $B10(Bcl-xL)=52$; $B10(каспаза-3-позитивные\ клетки)=3.1$).

Под действием дексаметазона уровни белка Bcl-xL во всех изученных полях гиппокампа демонстрировали динамику, в значительной

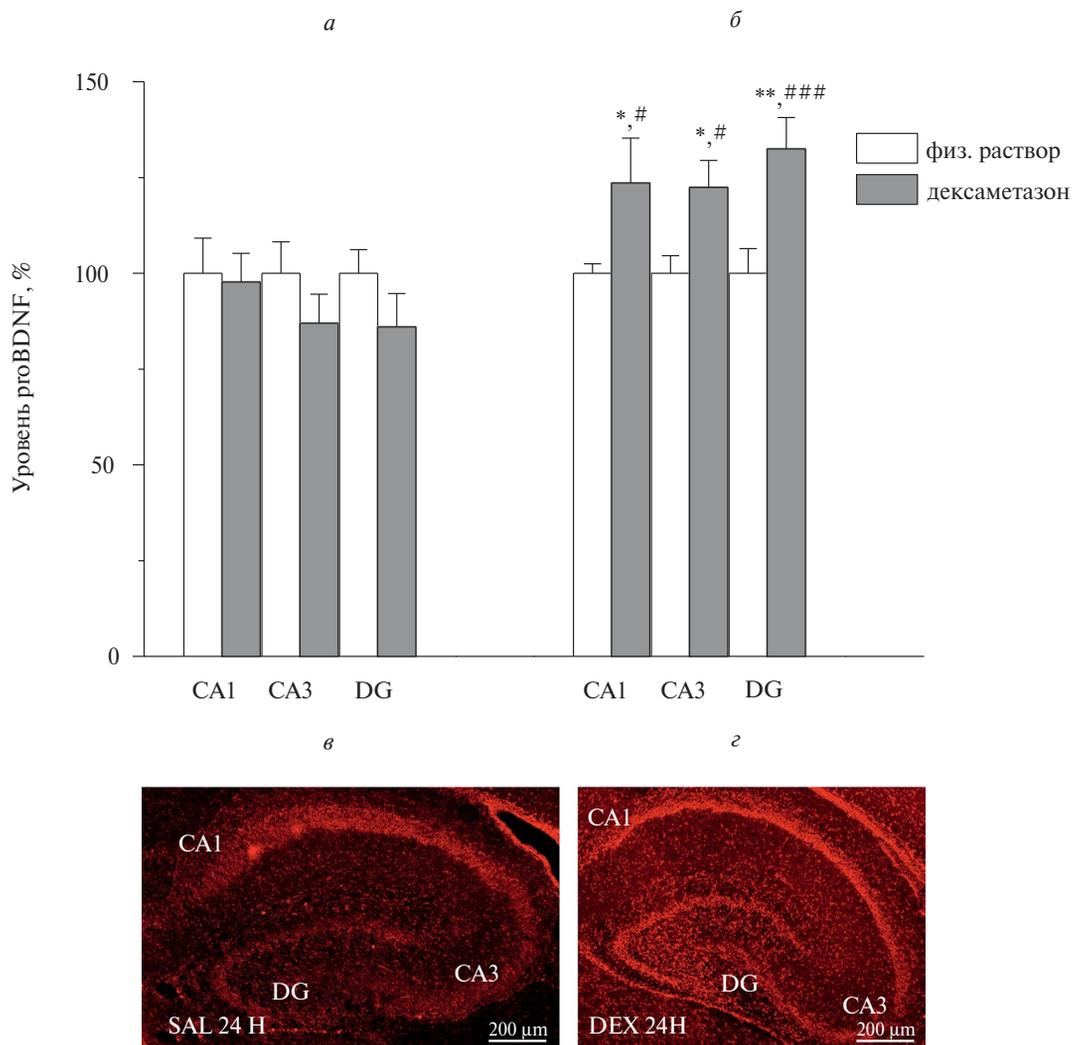


Рис. 2. Уровень proBDNF в областях гиппокампа неонатальных крысят через 6 часов (а) и 24 часа (б) после введения дексаметазона в процентах относительно группы с введением физиологического раствора. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению с введением физ. раствора, # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ по сравнению с соответствующими 6-часовыми группами.

Репрезентативные микрофотографии: белок proBDNF – красный сигнал (флуорофор Alexa-594) (в – через 24 часа после введения физраствора, г – через 24 часа после введения дексаметазона).

степени аналогичную изменениям уровней зрелой формы matBDNF (рис. 2 и 4; все поля – $R=+0.829$, $p=3.5 \cdot 10^{-13}$; CA1 – $R=+0.796$, $p=0.0002$; CA3 – $R=+0.805$, $p=0.0002$; зубчатая извилина – $R=+0.676$, $p=0.0051$). Первоначально, через 6 часов после введения препарата наблюдали кратковременный двукратный рост уровня Vcl-xL, за которым через 24 часа после воздействия следовало восстановление содержания этого антиапоптозного белка в гиппокампе (рис. 5; Факторы DEX*время – $F(1, 12)=18.03$, $p=0.0012$, $\eta^2=0.60$; Фактор DEX – $F(1, 12)=28.89$, $p=0.0002$, $\eta^2=0.71$). Уровни белка Vcl-xL также отрицательно коррелировали с соотношением форм нейротрофов

proBDNF/matBDNF (рис. 3 и 5; все поля – $R=-0.560$, $p=0.0001$).

В свою очередь, изменения числа каспаза-3-позитивных клеток во всех полях гиппокампа после введения дексаметазона повторяли динамику уровня формы нейротрофа proBDNF, однако не были сопряжены с ними напрямую (рис. 1 и 5). Вместе с тем, количество каспаза-3-позитивных клеток положительно коррелировало с соотношением форм нейротрофов proBDNF/matBDNF (рис. 3 и 5; все структуры – $R=+0.392$, $p=0.006$). Так, количество каспаза-3-позитивных клеток через 6 часов после воздействия было сопоставимо в полях гиппокампа между контрольными и получавшими дексаметазон группами (рис. 5).

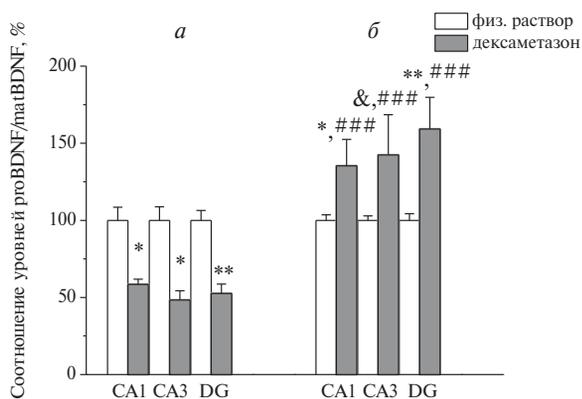


Рис. 3. Отношение уровней proBDNF к matBDNF в областях гиппокампа неонатальных крысят через 6 часов (а) или 24 часа (б) после введения дексаметазона в процентах относительно группы с введением физиологического раствора. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; & $p = 0.05$ по сравнению с введением физ. раствора, ### $p < 0.001$ по сравнению с соответствующими 6-часовыми группами.

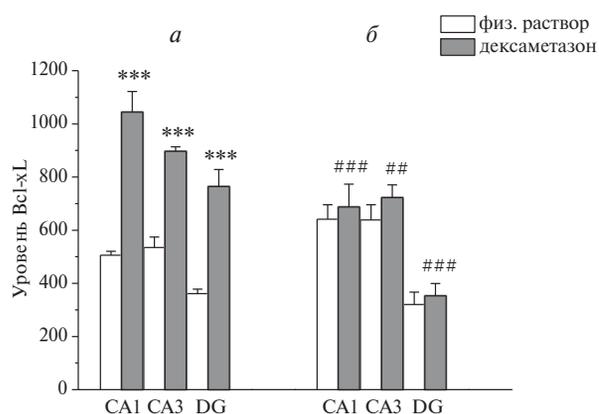


Рис. 4. Уровень Vcl-xL в областях гиппокампа неонатальных крысят через 6 часов (а) и 24 часа (б) после введения дексаметазона. *** $p < 0.001$ по сравнению с введением физ. раствора, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ по сравнению с соответствующими 6-часовыми группами.

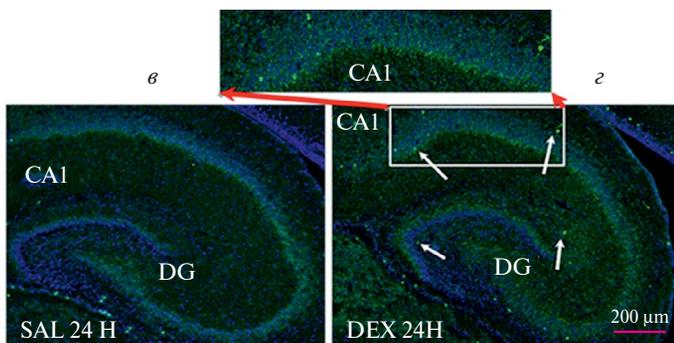
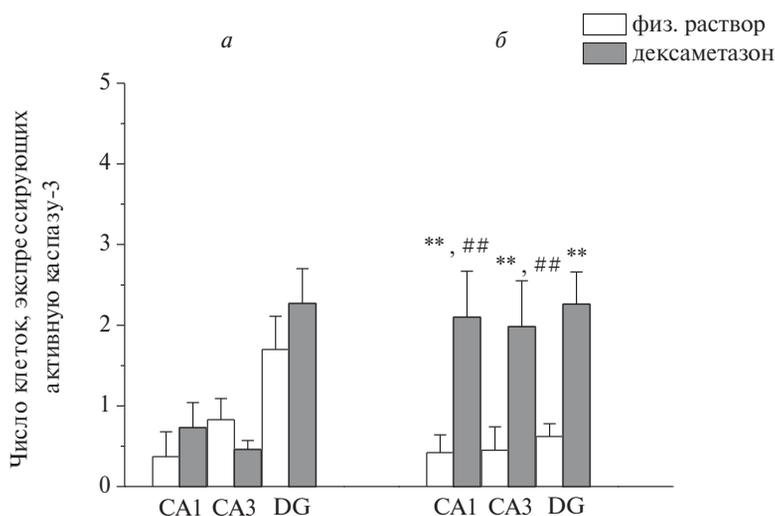


Рис. 5. Число клеток, экспрессирующих активную каспазу-3, в областях гиппокампа неонатальных крысят через 6 часов (а) или 24 часа (б) после введения дексаметазона. ** $p < 0.01$ по сравнению с введением физ. раствора, ## $p < 0.01$ по сравнению с соответствующими 6-часовыми группами. Репрезентативные микрофотографии: клетки, экспрессирующие активную каспазу-3 – зеленый сигнал (флуорофор Alexa-488) (а – через 24 часа после введения физраствора, б – через 24 часа после введения дексаметазона).

Затем, спустя 24 часа после воздействия количество каспаза-3-позитивных клеток росло во всех полях гиппокампа на фоне восстановления уровней антиапоптозного белка Bcl-xL и зрелой формы matBDNF (рис. 5; Факторы DEX*время – $F(1, 12)=9.72$, $p=0.009$, $\eta^2=0.45$; Фактор DEX – $F(1, 12)=8.49$, $p=0.013$, $\eta^2=0.41$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клетки гиппокампа высокочувствительны к повышению уровня глюкокортикоидов, особенно в перинатальный период, когда в этой структуре высока экспрессия глюкокортикоидных рецепторов [4]. Уже в первые часы после введения дексаметазона в гиппокампе неонатальных крысят увеличивается мРНК *c-fos* [28], маркер нейрональной активности [34], что сопровождается поведенческими нарушениями у неонатальных крысят [35]. Неонатальное введение дексаметазона на 1–3-й день жизни приводило к выраженному депрессивно-подобному поведению у взрослых крыс [36, 37] и увеличению тревожности [36]. Нейрохимические процессы, вовлекающиеся в патологические эффекты глюкокортикоидов в неонатальном гиппокампе, во многом до сих пор неясны, они могут затрагивать как процессы апоптоза, так и модификацию нейротрофических процессов, которая проявляется, как показано нами ранее, уже первые часы введения дексаметазона [33].

В нашей работе мы впервые показали, что однократная терапевтическая доза дексаметазона однотипно изменила уровень экспрессии зрелого мозгового нейротрофического фактора matBDNF и его предшественника proBDNF, а также модифицировала протекание процесса апоптотической гибели клеток во всех ключевых полях неонатального гиппокампа.

Через 6 часов после введения гормона в гиппокампе неонатальных крысят превалировала активация компенсаторных процессов, направленных на блокирование гибели клеток. Это отразилось в резком увеличении уровня белка matBDNF во всех полях структуры и его преобладании над уровнем незрелой формы – нейротрофина – proBDNF, а также повышенной экспрессии ключевого антиапоптотического белка Bcl-xL. Взаимосвязь между уровнем глюкокортикоидов и экспрессией нейротрофических факторов в гиппокампе и других отделах мозга известна [38, 39]. В нейронах взрослого гиппокампа глюкокортикоиды подавляют экспрессию мРНК *Bdnf* [40]. Трансляция, процессинг и секреция BDNF также регулируется глюкокортикоидами [7, 41, 42]. Молекулярным механизмом действия гормонов является глюкокортикоид-респонсивный элемент (Glucocorticoid Response Element (GRE)), который был обнаружен в промоторной области гена *Bdnf* [43]. Кроме

того, показано, что и сам мозговой нейротрофический фактор может участвовать в фосфорилировании глюкокортикоидных рецепторов [44]. Введение дексаметазона в нашем эксперименте приводило к значительному росту уровня ключевого антиапоптозного белка Bcl-xL в гиппокампе неонатальных крысят через 6 часов. Ранее рост экспрессии Bcl-xL в первые часы после введения дексаметазона были продемонстрированы в нашей лаборатории в стволе головного мозга 3-х дневных крысят [45]. Известно, что введение дексаметазона приводило к увеличению экспрессии Bcl-xL на уровне белка и мРНК в клетках глиомы C6 [46]. Прямое влияние глюкокортикоидов на экспрессию этого белка [47], также, как и для мозгового нейротрофического фактора, обеспечивается наличием GRE в промоторной области гена *Bcl-xL* [48]. Еще одной причиной увеличения гиппокампальной экспрессии антиапоптозного белка Bcl-xL, выявленного в нашей работе, может являться обнаруженное в гиппокампе повышение уровня экспрессии BDNF. Так, было показано, что введение в гиппокамп BDNF дозозависимо повышало в этой структуре экспрессию Bcl-xL как на уровне мРНК, так и на уровне белка [26].

Через 24 часа после введения дексаметазона достоверно возрастает число клеток, экспрессирующих каспазу-3, и это предполагаемое усиление процесса программируемой клеточной гибели сопровождается увеличением уровня белка proBDNF в областях гиппокампа с преобладанием над matBDNF. Преобладание пронейротрофина, по-видимому, и провоцирует увеличение клеток, экспрессирующих активную каспазу-3, поскольку пронейротрофины способны индуцировать апоптоз даже в присутствии трофической поддержки жизнеспособности клеток зрелыми формами факторов [24]. Повышение уровня белка proBDNF при воздействии кортикостерона была показана *in vitro* на первичной культуре клеток гиппокампа [49], а длительное введение кортикостерона приводило к увеличению уровня белка proBDNF в гиппокампе и провоцировало развитие депрессивно-подобного поведения у взрослых мышей [50]. Что касается изменений в экспрессии мРНК *Bdnf*, то данные противоречивы. К примеру, хронический стресс [51] или воздействие повышенным уровнем экзогенных глюкокортикоидов [52] приводит к снижению экспрессии мРНК *Bdnf* в гиппокампе [53]. Другие исследователи обнаружили рост этого параметра в гиппокампе взрослых мышей после 15 дневного стресса [54].

В целом, введение дексаметазона меняет соотношение про- и зрелой формы нейротрофического фактора в гиппокампе неонатальных крыс. Активация компенсаторных процессов в первые 6 часов после введения гормона (повышение уровня экспрессии гена *Bdnf*, рост белков matBDNF и Bcl-xL)

меняется через сутки усилением апоптотических процессов (увеличение белка proBDNF и числа клеток с активной каспазой-3), что подтверждается смещением соотношения proBDNF/matBDNF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение дексаметазона меняет соотношение про- и зрелой формы нейротрофического фактора BDNF в незрелом гиппокампе трехдневных крысят. При этом первоначальные сдвиги в пользу нейропротективных процессов, наблюдаемые спустя 6 часов после введения синтетического гормона (повышение уровня экспрессии гена *Bdnf*, рост белков matBDNF и Vcl-xL), в дальнейшем сменяются усилением ассоциированных с апоптозом изменений (увеличение белка proBDNF и числа клеток с активной каспазой-3). Не исключено, что такая динамика действия глюкокортикоидов может провоцировать изменения неврологического и поведенческого статуса, в том числе и долговременные, что требует дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0023.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carson R., Monaghan-Nichols A.P., DeFranco D.B., Rudine A.C. // *Steroids*. 2016. V.114. P. 25–32.
2. Shinwell E.S., Eventov-Friedman S. // *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2009. V.14. P.164–70.
3. Doyle L.W., Cheong J.L., Ehrenkranz R.A., Halliday H.L. // *Cochrane Database Syst Rev.* 2017. V.10. Rev. 2021.
4. van Eekelen J.A., Bohn M.C., de Kloet E.R. // *Dev. Brain Res.* 1991. V. 61. P. 33–43.
5. Altwawi W.Y., Melemedjian O.K., Jaoude M.M. // *J. Leukoc. Biol.* 2004. V. 6. P. 7–14.
6. Duksal F., Kilic I., Tufan A. C., Akdogan I. // *Brain Res.* 2009. V. 1250. P. 75–80.
7. Numakawa T., Odaka H., Adachi N. // *Int J Mol Sci.* 2017. V. 18(11).
8. Neeley E.W., Berger R., Koenig J.I., Leonard S. // *Neuroscience.* 2011. V. 187. P. 24–35.
9. Suri D., Vaidya V.A. // *Neuroscience.* 2013. V. 239. P. 196–213.
10. Bennett M.R., Lagopoulos J. // *Prog. Neurobiol.* 2014. V. 112. P. 80–99.
11. Roth T., Sweatt J. // *Horm Behav.* 2011. V. 59. P. 315–320.
12. Leal G., Bramham C.R., Duarte C.B. // *Vitam Horm.* 2017. V. 104. P. 153–195.
13. Bruno M.A., Cuello A.C. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2006. V. 103. P. 6735–40.
14. Yang J Harte-Hargrove L.C., Siao C.J., Marinic T., Clarke R., Ma Q., Jing D., Lafrancois J.J., Bath K.G., Mark W., Ballon D., Lee F.S., Scharfman H.E., Hempstead B.L. // *Cell Rep.* 2014. V. 7. P. 796–806.
15. Fayard B., Loeffler S., Weis J., Vögelin E., Krüttgen A. // *J Neurosci Res.* 2005. V. 80. P. 18–28.
16. Lessmann V., Brigadski T. // *Neurosci Res.* 2009. V. 65. P. 11–22.
17. Teng K.K., Felice S., Kim T., Hempstead B.L. // *Dev Neurobiol.* 2010. V. 70. P. 350–9.
18. Costa R.O., Perestrelo T., Almeida R.D. // *Mol Neurobiol.* 2018. V. 55. P. 2934–2951.
19. Rösch H., Schweigreiter R., Bonhoeffer T., Barde Y.A., Korte M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. 102. P. 7362–7.
20. Yang J., Chia-Jen Siao C-J., Nagappan G., Marinic T., Jing D., McGrath K., Zhe-Yu Chen Z-Y., Mark W., Tessarollo L., Lee F.S., Lu B., Hempstead B.L. // *Nat Neurosci.* 2009. V. 12. P. 113–115.
21. Menshanov P.N., Lanshakov D.A., Dygalo N.N. // *Physiol Res.* 2015. 64. 925–934.
22. Koshimizu H., Hazama S., Hara T., Ogura A., Kojima M. // *Neurosci Lett.* 2010. V. 473. P. 229–32.
23. Volosin M., Trotter C., Cragolini A., Kenchappa R.S., Light M., Hempstead B.L., Carter B.D., Friedman W.J. // *J Neurosci.* 2008. V. 28. P. 9870–9879.
24. Yuan J., Yankner B.A. // *Nature.* 2000. V. 407. P. 802–9.
25. Renton J.P., Xu N., Hansen M. // *J Neurosci Res.* 2010. V. 88. P. 2239–51.
26. Chao C.C., Ma Y.L., Lee E.H. // *Brain Pathol.* 2011. V. 2. P.150–62.
27. Miracle X., Di Renzo G.C., Stark A., Fanaroff A., Xavier Carbonell-Estrany X., Saling E. // *J. Perinat. Med.* 2008. V. 36(3). P. 191–196.
28. Булыгина В.В., Шишкина Г.Т., Березова И.В., Дыгало Н.Н. // Докл. академии наук. 2011. Т. 437. № 4. С. 565–567.

29. *Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N.* // *Neurobiology of Disease*. 2016. V. 91. P. 1–9.
30. *Bulygina V.V., Kalinina T.S., Lanshakov D.A., Dygalo N.N.* // *Neurochemical Journal*. 2019. V. 13. P. 349–354.
31. *Lindholm D., Castren E., Hengerer B., Zafra F., Berninger B., Thoenen H.* // *Eur. J. Neurosci*. 1992. V. 4(5). P. 404–410.
32. *Lanshakov D.A., Bulygina V.V., Romanova I.V., Dygalo N.N.* // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2009. V.147. N. 5. P. 635–638.
33. *Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Bulygina V.V., Lagunov T.A., Kalinina T.S.* // *Integrative Physiology*. 2021. V. 2. P. 41–48.
34. *Kovács K.J.* // *Neurochem. Int*. 1998. V. 33. P. 287–297.
35. *Menshanov P.N., Bannova A.V., Dygalo N.N.* // *Behav. Brain Res*. 2014. V. 271. P. 43–50.
36. *Ko M.C., Hung Y.H., Ho P.Y., Yang Y.L., Lu K.T.* // *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014. V. 17. P. 1995–2004.
37. *Li S.X., Zhang J.C., Wu J., Hashimoto K.* // *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2014. V. 12. P. 124–127.
38. *Gulyaeva N.V.* // *Biochemistry (Mosc)*. 2023. V. 88. P. 565–589.
39. *Numakawa T., Kajihara R.* // *Front Mol Neurosci*. 2023. V. 16:1247422.
40. *Schaaf M.J., Hoetelmans R.W., de Kloet E.R., Vreugdenhil E.* // *J Neurosci Res*. 1997. V. 48. P. 334–341.
41. *Chen H., Lombès M., Le Menuet D.* // *Mol Brain*. 2017. V. 10. P. 1–16.
42. *Eachus H., Ryu S.* // *J Exp Biol*. 2024. V. 227(Suppl_1).
43. *Tsimpolis A., Kalafatakis K., Charalampopoulos I.* // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024. V. 15:1362573.
44. *Arango-Lievano M., Lambert W.M., Bath K.G., Garabedian M.J., Chao M.V., Jeanneteau F.* // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015. V. 112. P. 15737–42.
45. *Shishkina G.T., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Lanshakov D.A., Babluk E.V., Dygalo N.N.* // *PLoS One*. 2015. V. 10. P. e0143978.
46. *Ní Chonghaile T., Concannon C.G., Szegezdi E., Gorman A.M., Samali A.* // *Apoptosis*. 2006. V. 11. P. 1247–1255.
47. *Rocha-Viegas L., Silbermins M., Ogara M.F., Pellegrini J.M., Nuñez S.Y., García V.E., Vicent G.P., Pecci A.* // *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2020. V. 1863. P. 194475.
48. *Gascoyne D.M., Kypta R.M., Vivanco Md.* // *J Biol Chem*. 2003. 278. P. 18022–18029.
49. *Liu Y., Zou G.J., Tu B.X.* // *Neurotox Res*. 2020. V. 38. P. 370–384.
50. *Lin L., Herselman M.F., Zhou X.F., Bobrovskaya L.* // *Physiol Behav*. 2022. V. 247. P. 113721.
51. *Duman R.S., Aghajanian G.K., Sanacora G., Krystal J.H.* // *Nat Med*. 2016. V. 22. P. 238–249.
52. *Nicholas A., Munhoz C.D., Ferguson D., Campbell L., Sapolsky R.* // *J Neurosci*. 2006. V. 26. P. 11637–11643.
53. *Hossain A., Hajman K., Charitidi K., Erhardt S., Zimmermann U., Knipper M., Canlon B.* // *Endocrinology*. 2008. V. 149. P. 6356–6365.
54. *Hashikawa N., Ogawa T., Sakamoto Y., Ogawa M., Matsuo Y., Zamami Y., Hashikawa-Hobara N.* // *Cell Mol Neurobiol*. 2015. V. 35. P. 807–817.

Expression of Pro- and Mature Brain Neurotrophic Factor and Bcl-xL in the Hippocampus of Neonatal Rats under Dexamethasone Treatment

V. V. Bulygina¹, T. S. Kalinina^{1,2}, D. A. Lanshakov¹, P. N. Menshanov, E. V. Suhareva¹, and N. N. Dygalo^{1,2}

¹*The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirskiy State University, Novosibirsk, Russia*

Due to the key role of neurotrophins in brain development and plasticity, the question of whether and how the precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) can influence the active elimination of excess cells by apoptosis is of great importance. It is supposed that proneurotrophins selectively activate the neurotrophin receptor p75, thereby inducing proapoptotic signaling pathways, while mature BDNF (matBDNF) has an antiapoptotic effect. Rationale: proBDNF and matBDNF will exhibit specific expression patterns that modify the process of apoptosis in the brain of neonatal rats under induction by glucocorticoids. Thus, the study examined the effect of the glucocorticoid dexamethasone (DEX) on the levels of mRNA of BDNF and the key protease of apoptosis caspase-3, the number of cells expressing active caspase-3, as well as the proteins proBDNF, matBDNF and the key anti-apoptotic protein BCL-xL in the hippocampus of 3–4 day old rat pups in 6 or 24 hours after DEX administration.

In 6 hours, DEX induced anti-apoptotic processes, namely, it increased the levels of *bdnf* mRNA in the whole hippocampus, as well as the content of matBDNF and Bcl-xL proteins in the CA1-3 fields and the dentate gyrus. In this case, a temporary predominance of matBDNF expression over apoptogenic proBDNF was formed against the background of a constant number of cells expressing active caspase-3. In 24 hours, DEX provoked an increase in the expression of apoptogenic proBDNF, and its prevalence over mature neurotrophin in all fields of the hippocampus, accompanied by an increase in the number of cells, expressing active caspase-3. Moreover, we found a significant correlation between the proBDNF/matBDNF ratio and active caspase-3 in all three areas of the hippocampus. It has been shown that proBDNF has its own expression pattern—different from its mature form—in the hippocampus of neonatal rats upon DEX induction and the manifestation of its proapoptotic effect is accompanied by an increase in the proBDNF/matBDNF ratio.

Keywords: proBDNF, matBDNF, Bcl-xL, active caspase-3, hippocampus, dexamethasone

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 612.82, 612.43

ЭКСПРЕССИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗЛИЧНЫХ
ТИПАХ КЛЕТОК ГИППОКАМПА И КОРЫ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС

© 2024 г. Д. А. Ланшаков^{1, 2, *}, У. С. Дрозд^{1, 2}, Н. Н. Дыгало^{2, 3}

¹ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, сектор постгеномной нейробиологии, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук, Новосибирск, Россия

³ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, лаборатория функциональной нейрогеномики, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 02.07.2024 г.

Принята к публикации 08.07.2024 г.

Глюкокортикоиды (ГК) являются критически важными регуляторами гомеостаза и функций организма. Несмотря на серьезные последствия, терапия глюкокортикоидами у новорожденных широко используется антенатально для ускорения созревания легких плода в случаях преждевременных родов. Действие ГК опосредуется через рецепторы глюкокортикоидов (ГР) – лиганд-зависимые транскрипционные факторы. Многие известно об экспрессии ГР во взрослом мозге, однако, информации о специфичности и идентичности клеток, в которых экспрессируются ГР в неонатальном мозге, не так много. В этой работе мы исследовали колокализацию ГР с основными маркерами нейронов и астроцитов в мозге новорожденных крысят. Иммуногистохимически мы выявили в поле СА1 гиппокампа и энторинальной коре экспрессию ГР и маркеров кортикальных проекционных нейронов – SATB2 и NURR1; маркеров интернейронов – кальретенина и маркеров астроцитов – GFAP. Самые высокие коэффициенты колокализации наблюдались у ГР с кальретенином. С маркером проекционных нейронов, который также является фактором транскрипции, коэффициенты колокализации увеличивались до тех же значений, что и для ГР с кальретенином, через 6 ч после инъекции дексаметазона, когда ГР транслоцировались в ядро. Таким образом, анализ показал, что в мозге неонатальных крысят ГР больше локализован в нейронах, чем в астроцитах.

Ключевые слова: рецепторы глюкокортикоидов, маркеры клеточных типов, развитие, гиппокамп, неокортекс

DOI: 10.31857/S1027813324030055, EDN: EQJVXP

ВВЕДЕНИЕ

Глюкокортикоиды (ГК) регулируют множество физиологических функций и необходимы для созревания, развития, метаболизма и выживания эмбриона [1]. Кортикостероиды синтезируются в коре надпочечников и секретируются в кровь, что позволяет им оказывать влияние на различные типы клеток по всему телу, включая центральную нервную систему (ЦНС) [2]. Они играют ключевую роль в ответе на стрессор и регуляции гипоталамо-гипофизарной оси. ГК осуществляют свое действие через рецепторы глюкокортикоидов (ГР) – лиганд-зависимые факторы транскрипции [3–4]. Большие дозы глюкокортикоидов используются в перинатальной медицине для ускорения созревания легких у плода, когда у женщины имеется риск преждевременных родов [5, 6], в это время развивающаяся нервная система особенно уязвима для

различных воздействий [7]. В неонатальном мозге ГК вызывают апоптоз нейронов и их предшественников [8]. Воздействие ГК в перинатальном периоде оказывает негативное влияние на дальнейшее развитие нервной системы и вызывает нарушения в поведении [9–11]. Функции гиппокампа особенно подвержены влиянию ГК, поскольку ГР в большей степени экспрессируются в этой структуре мозга [12]. У взрослых животных ГК путем острой модуляции возбудимости нейронов и прямого изменения экспрессии генов через действие ГР могут влиять на пространственную и рабочую память и реакцию на новизну [13, 14].

Для более полного понимания возможных последствий воздействия ГК на развивающуюся нервную систему важно знать, в клеточных типах какой специфичности и идентичности ГР экспрессируются в неонатальном мозге. Их действие

в неонатальном мозге до сих пор остается не вполне ясным ввиду разницы между активируемыми ГК сигнальными путями и их функциями у взрослых и в неонатальном возрасте.

В этой работе мы иммуногистохимически выявляли экспрессию ГР и ключевых маркеров клеточных типов ЦНС. Мы исследовали экспрессию ГР у неонатальных крысят в поле СА1 гиппокампа и энторинальной коре – областях наибольшей экспрессии ГР. Эти структуры мозга принимают критически важное участие в формировании стресс-реактивности, памяти и мышления у взрослых. В энторинальной коре исследовалась колокализация ГР с маркерами нейронов верхних слоев коры SATB2, нейронов субплатинки NURR1, астроцитов GFAP и интернейронов кальретинином (CALRET), в области СА1 гиппокампа только с GFAP и кальретинином.

Подробная информация о типах клеток, в которых экспрессируются ГР, поможет пролить свет на механизмы действия ГК в неонатальном мозге. Кроме того, эти результаты могут помочь будущей разработке методов снижения негативных побочных эффектов неонатальной глюкокортикоидной терапии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и дизайн эксперимента. Все процедуры с животными проводились в соответствии с Международными Европейскими Биоэтическими стандартами (Директива ЕС 2010/63/EU), Российскими правилами работы над лабораторными животными (приказ № 199N от 1 апреля 2016) и были разрешены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН (протокол № 19 от 26.11.2013). Беременные самки крыс линии Wistar содержались в виварии ИЦиГ СО РАН индивидуально в клетках (40 см × 25 см × 15 см) в условиях свободного доступа к воде и корму, при температуре 22–24°C. Первым днем жизни крысят считали день рождения. Для эксперимента использовали по 4 животных обоих полов в группе. 0.2 мг/кг фосфата дексаметазона (DEX, KRKA Словения) вводили подкожно на третий день жизни, материал забирала через 6 часов. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

Иммуногистохимия. В послеродовый день 3 животных наркотизировали авертином и транскардиально перфузировали 0.01 М PBS, затем 4% PFA. Извлеченный мозг постфиксировали 12 часов в 4% PFA, затем сутки в 30% сахарозе, после чего замораживали в OCT при температуре –80°C. Для иммуногистохимического анализа готовились срезы толщиной 18 мкм при помощи криотома MICRON HM 550 и размещались на стеклах Superfrost. Срезы промывали в 1xPBS, затем в 1xPBS с 0.1% Tween-20 (1xPBST).

Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в 1xPBST, содержащем 1.5 % BSA, в течение часа при комнатной температуре. С первичными антителами срезы инкубировали в течение ночи при температуре +4°C. Антитела разводили в 1xPBST, содержащем 1.5 % BSA в разведении 1:200 (anti SATB2 sc-81376, anti NURR1 sc-376984, anti GR sc-8992, anti CALRETHENIN, Santa Cruz США). После инкубации с первичными антителами срезы промывали в PBST, затем в PBS и инкубировали с вторичными антителами (donkey anti mouse Alexa 568, Jackson immuno США для маркеров клеточных типов, donkey anti rabbit Alexa 488, Jackson immuno США для ГР) в разведении 1:400 в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем промывали в 1xPBS и заключали в среду, содержащую ядерный краситель DAPI (Mowiol, 2.5% DABCO, 1 µg/ml DAPI Sigma Aldrich США) и хранили защищенными от света при +4°C.

Микроскопия. Препараты фотографировали с помощью конфокального микроскопа LSM780NLO (“Carl Zeiss”, Германия) с использованием 488 нм, 561 нм и 405 нм лазеров. Панорамные изображения всего мозга были получены с использованием сканирующего режима мозаики. Изображения для анализа колокализации были получены при помощи объектива с высокой числовой апертурой и 40-кратным увеличением (EC Plan NEOFLUAR 40x/1.3 Oil DIC). Параметры колокализации (коэффициент корреляции Пирсона, коэффициент перекрытия Мандерса, взвешенные коэффициенты колокализации tM1 и tM2)

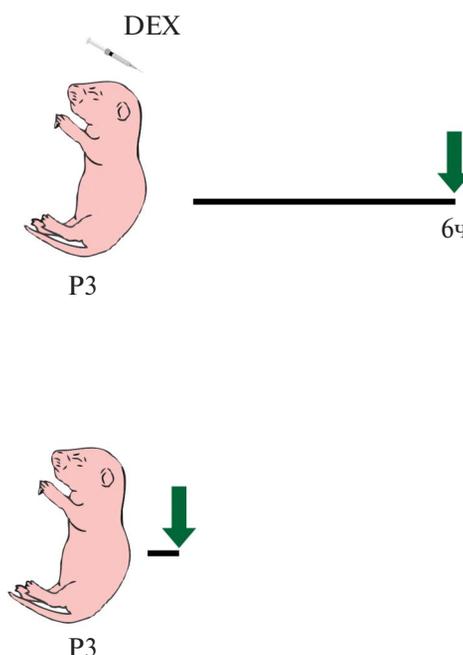


Рис. 1. Схема эксперимента. Стрелкой обозначен забор материала.

определяли в программе ZEN при помощи панели инструментов колокализации. Коэффициент Пирсона отражает корреляцию значений интенсивности сигналов и изменяется от -1 до 1 . Коэффициент перекрытия Мандерса показывает общую колокализацию и изменяется от 0 до 1 . Дробные коэффициенты колокализации tM1 и tM2 показывают, какая часть пикселей других каналов локализована в области пикселей первого канала. tM1 отражает часть красных пикселей в зеленой области, и, наоборот, tM2 указывает часть зеленых пикселей в красной области [15–19]. Всего было проанализировано 10 изображений на одно животное.

Статистический анализ. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0. Коэффициенты перекрытия анализировались с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Статистически значимыми считали изменения при $p < 0.05$. Межгрупповые различия были проанализированы с использованием апостериорного анализа по Фишеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия ГР и маркеров клеточных типов в мозге неонатальных крысят. В конечном мозге новорожденных крыс, как и ожидалось, наибольшее мечение ГР было обнаружено в поле CA1 гиппокампа (рис. 2). Умеренное окрашивание ГР наблюдалось в энторинальной коре. Цитоплазматические маркеры клеточных типов, такие как

специфичный для интернейронов кальретенин (CALRET) или глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), экспрессируемый астроцитами, хорошо выявлялся в гиппокампе и коре головного мозга новорожденных крыс. Другие маркеры клеточных типов, локализованные в ядре, – родственный ядерному рецептору белок 1 (NURR1), постнатальный маркер клеток кортикальной субпластинки, а также SATB2, экспрессирующийся в верхних слоях развивающейся неокортекса, хорошо выявлялись в этих областях мозга 3-дневных крысят.

Колокализация ГР с цитоплазматическими маркерами клеточных типов. Иммунореактивность ГР была наиболее распространена в цитоплазме клеток гиппокампа и коры. Это наблюдение было подтверждено анализом колокализации ГР с цитоплазматическим белком, используемым в качестве маркера интернейронов – CALRET (рис. 3а-б; табл. 1). Более 50% иммуногистохимических сигналов GR колокализовались с сигналами CALRET в поле CA1 гиппокампа, а также в энторинальной коре. Высокий уровень экспрессии ГР был специфичен для нейронов этих участков мозга. Колокализация иммуногистохимических сигналов ГР с астроцитарным маркером GFAP была значительно ниже, чем с маркером интернейронов CALRET. В энторинальной коре и гиппокампе коэффициенты Мандерса (MOC) и коэффициент корреляции Пирсона (R_p), как и коэффициент фракционного перекрытия tM2, были значительно выше для ГР с кальретенином, чем для ГР с GFAP

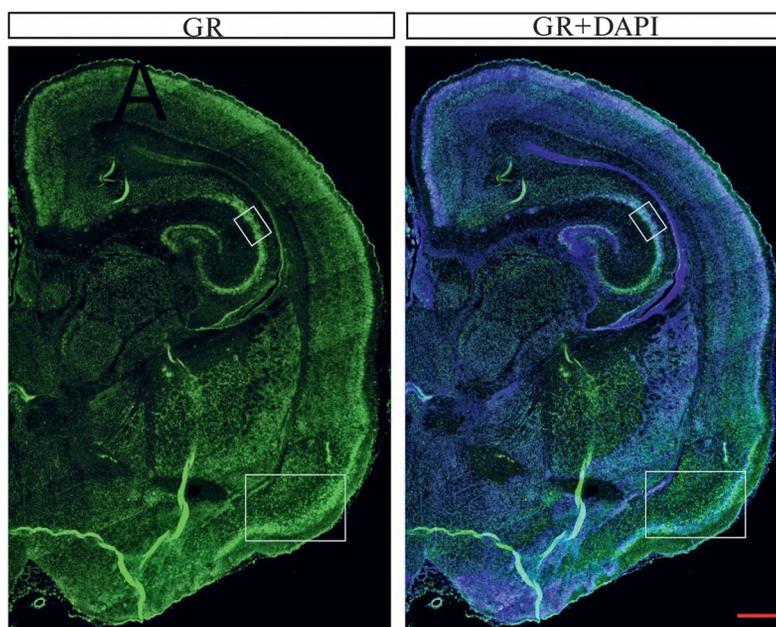


Рис. 2. Экспрессия ГР в мозге неонатальных крысят на 3 день жизни. ГР – зеленый, Alexa 488. На панорамных изображениях окрашивания по ГР (1А) область CA1 гиппокампа и энторинальная кора отмечены белыми рамками. Шкала 500 мкм.

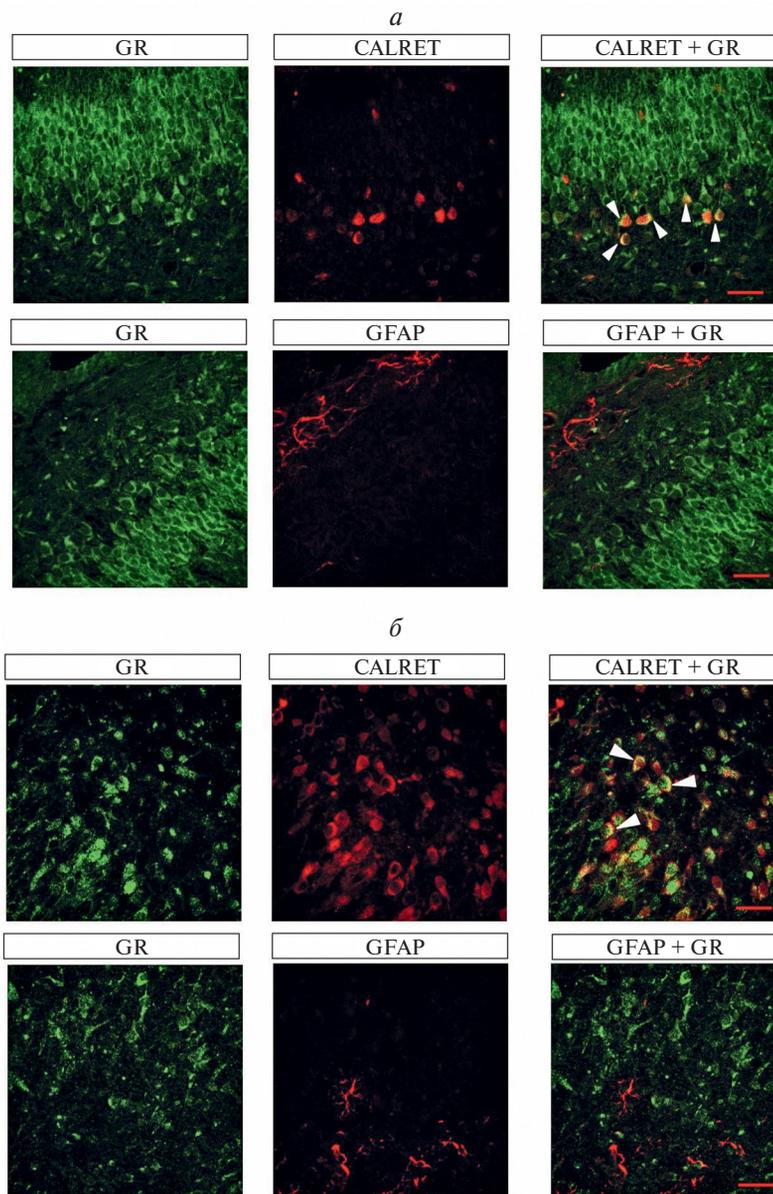


Рис. 3. Изображения двойного иммунофлуоресцентного окрашивания ГР (зеленый, Alexa 488) и маркеров клеточных типов (красный, Alexa 568), снятые при помощи объектива с высокой числовой апертурой и 40-кратным увеличением в области CA1 гиппокампа (*а*) и энторинальной коре (*б*). Места колокализации отмечены белыми треугольниками. Шкала 50 мкм.

(MOC: $F(7,28)=26.052$; Rp: $F(7,28)=6.9548$; tM1: $F(7,28)=7.8681$; tM2: $F(7,28)=20.551$). Сигналы ГР и GFAP в основном не были колокализованы.

Колокализация ГР с ядерными маркерами клеточных типов. Иммуногистохимические сигналы NURR1 и SATB2 локализовались в ядрах корковых нейронов (рис. 4а, табл. 2), что естественно для транскрипционных факторов. Малая колокализация ГР с этими факторами подтверждают, что в мозге новорожденных крыс в естественных условиях большая часть ГР локализована в цитоплазме

нейронов. Коэффициенты колокализации ГР с маркерами типов ядерных клеток в естественных (“контрольных”) условиях были относительно низкими (табл. 2). У взрослых животных транслокация ГР из цитоплазмы в ядро зависит от активации рецептора ГК. Эндогенный уровень глюкокортикоидного гормона в крови новорожденных крыс очень низок [20]. Согласно представленным здесь результатам, естественного уровня гормона было недостаточно для активации ГР и индукции их транслокации в ядро. Проблема исключительно

Таблица 1. Коэффициенты колокализации ГР с цитоплазматическими маркерами клеточных типов

Область	Маркер клеточного типа	Коэффициенты колокализации			
		МОС	Rp	tM1	tM2
Гиппокамп (CA1)	CALRET	0.53±0.04*	0.15±0.01*	0.45±0.08	0.07±0.01
	GFAP	0.33±0.04	0.1±0.09	0.02±0.01	0.01±0.01
Энторинальная кора	CALRET	0.62±0.02*	0.12±0.01*	0.28±0.07	0.56±0.12*
	GFAP	0.33±0.03	0.02±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01

МОС – коэффициент перекрытия Мандерса, Rp – коэффициент корреляции Пирсона, tM1, tM2- коэффициенты перекрытия фракций, * – $p < 0.05$ по сравнению с GFAP.

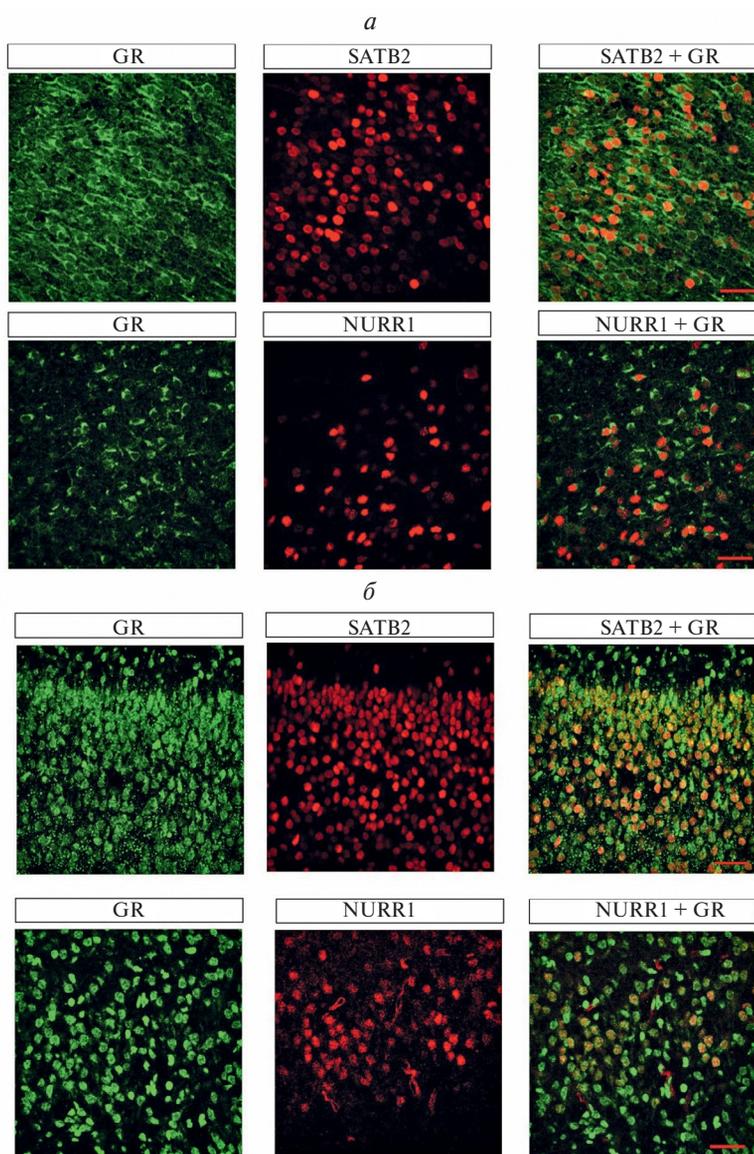


Рис. 4. Изображения двойного иммунофлуоресцентного окрашивания ГР (зеленый, Alexa 488) и маркеров клеточных типов (красный, Alexa 568), снятые при помощи объектива с высокой числовой апертурой и 40-кратным увеличением в энторинальной коре до (а) и после (б) введения DEX. ГР транслоцировались в ядро клетки через 6 часов после введения DEX в энторинальную кору. Шкала 50 мкм.

Таблица 2. Коэффициенты колокализации ГР с ядерными маркерами клеточных типов

Воздействие	Маркер клеточного типа	Коэффициенты колокализации			
		МОС	Rp	tM1	tM2
Контроль	NURR1	0.39±0.01	0.05±0.02	0.17±0.05	0.64±0.06*
	SATB2	0.46±0.03	0.04±0.02	0.09±0.01	0.87±0.09*
DEX	NURR1	0.67±0.03*	0.12±0.01*	0.03±0.01	0.94±0.02*
	SATB2	0.67±0.02*	0.09±0.02*	0.43±0.07*	0.89±0.04

МОС – коэффициент перекрытия Мандерса, Rp – коэффициент корреляции Пирсона, tM1, tM2- коэффициенты перекрытия фракций, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

в низком уровне гормона, а не в нарушении функций самого ГР или белков, участвующих в его действии. Действительно, если новорожденным крысам вводили экзогенный глюкокортикоид DEX за 6 часов до отбора проб, почти все иммуногистохимические сигналы GR были обнаружены в ядре (рис. 4б) и хорошо колокализировались с NURR1 и SATB2 (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В мозге новорожденных ГК оказывают разнообразные эффекты, которые зависят от региона мозга, типа клеток и возраста. Ранее было показано, что в гиппокампе и коре головного мозга ГР экспрессируется от умеренного до высокого уровня, с максимальным уровнем экспрессии в гиппокампе [12–21]. Точный анализ того, какие клетки мозга экспрессируют ГР, безусловно, поможет понять механизм действия ГК в мозге новорожденных. В этой работе мы впервые исследовали колокализацию ГР с основными маркерами клеточного типа ЦНС в мозге неонатальных крысят. В поле CA1 гиппокампа была исследована колокализация ГР с маркером ГАМК-ергических интернейронов – кальретенином и маркером астроцитов – GFAP, а в энторинальной коре – кроме этого, с теми маркерами проекционных нейронов, которые экспрессируются в коре больших полушарий: SATB2 и NURR1.

В энторинальной коре и области CA1 гиппокампа неонатальных крысят контрольной группы ГР преимущественно был локализован в кальретениновых интернейронах. Наибольшая колокализация ГР с кальретенином могла быть обусловлена цитоплазматической локализацией ГР в исследованных интернейронах при базальном уровне ГК. Коэффициенты колокализации с факторами транскрипции SATB2 и NURR1, которые локализованы в ядре, были ниже, чем коэффициенты для ГР с кальретенином. Однако они

увеличились после введения DEX и транслокации ГР в ядро клетки. Таким образом была продемонстрирована цитоплазматическая локализация ГР при базальном уровне ГК и транслокация ГР в ядро после введения DEX.

Показано, что в ходе эмбрионального развития ГР могут иметь разную субклеточную локализацию в разных популяциях предшественников нейронов: на 11.5 день эмбрионального развития мышцы в большинстве Рах6-позитивных радиальных глиальных клеток (RGC) и Tbr2-позитивных промежуточных клеток-предшественников (IPC) ГР локализованы в ядре, а в небольшой части RGC в апикальных желудочках – в цитоплазме [22]. В ходе дальнейшего развития мозга субклеточная локализация ГР меняется. Изменения характера экспрессии вместе с изменениями субклеточной локализации могут оказывать различное влияние на действие ГК в ткани головного мозга, что зависит от типа клеток, региона мозга и возраста.

Кроме регуляции экспрессии генов, ГР также обладает быстрым негеномным механизмом действия, опосредованным через мембранные рафты, ассоциированные с ГР [23], а также через сигнальный путь ERK1/2-MSK1-Elk-1 [24]. У взрослых реакция на новый стресс и негеномное действие ГР зависят от ГАМК-ергической нейротрансмиссии. ГАМК тонически контролирует эпигеномные реакции на психологически значимые события в нейронах зубчатой извилины [25]. Кроме того, ГАМК, по-видимому, осуществляет свою контролирующую активность посредством модуляции функции рецептора NMDA [26]. Однако в отличие от взрослых, у неонаталов ГАМК может действовать как возбуждающий нейромедиатор [27]. Одновременная активация ГАМК- и глутаматергической нейротрансмиссии в мозге новорожденных под действием ГК может привести к дисбалансу нейромедиаторов и эксайтотоксичности. Показано, что введение DEX в неонатальный период вызывает эксайтотоксическую гибель нейронов

основания гиппокампа [28]. Эти сведения дополняет полученный результат об экспрессии ГР в кальцитриновых ГАМК-ергических нейронах области CA1 гиппокампа неонатальных крыс. Кроме этого мы продемонстрировали экспрессию ГР в нейронах энторинальной коры, экспрессирующих SATB2 и NURR1. SATB2 – это ДНК-связывающий белок, который связывается с областями прикрепления матрикса и регулирует организацию хроматина и экспрессию генов [29, 30]. В мозге эмбриона он преимущественно экспрессируется в нейронах верхних слоев коры, аксоны которых идут через мозолистое тело [31, 32]. В отсутствие SATB2 в этих нейронах теряется идентичность и активируется генетическая программа, направляющая развитие по пути становления нейронами нижних слоев коры [31, 32]. NURR1 – это транскрипционный фактор, принадлежащий к суперсемейству орфанных ядерных рецепторов [33], который имеет решающее значение для спецификации, развития и поддержания дофаминергической системы, в неокортексе он экспрессируется в энторинальной коре и субпластинке. Первые кортикальные нейроны получают синаптические входы от аксонов таламуса, устанавливая временную связь между аксонами таламуса и их конечной целью в IV слое коры [35–39]. Эти нейроны являются первыми нейронами, проявляющими разрядную активность, в эмбриональном неокортексе [40–43]. Экспрессия ГР в этих нейронах и, что примечательно, транслокация ГР в ядро после введения DEX у неонатальных крысят так же подчеркивает их чувствительность к ГК и уязвимость для их негативного действия.

В тоже время мы обнаружили, что наименьшая колокализация ГР наблюдалась с GFAP, маркером астроглии. С одной стороны, это может быть объяснено тем, что GFAP является белком промежуточных филаментов, и GFAP с ГР локализованы в разных клеточных компартментах, с другой стороны – низким уровнем экспрессии ГР в астроцитах. Даже в клеточной культуре только 50% астроцитарных клеток проявляют иммунореактивность к ГР [44]. Косвенным подтверждением этого является то, что головном мозге новорожденных крысят DEX вызывал гибель клеток-предшественников в зубчатой извилине, но не астроцитов [44]. Мозг представляет собой очень сложную структуру, состоящую из нейронов, глиальных клеток, олигодендроцитов и эндотелиальных клеток кровеносных сосудов ЦНС. Циркулирующая кровь отделена от клеток ЦНС гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), который создает градиенты поступающих в мозг веществ, например, гормонов. Предположительно, уровень ГК снижается при движении от сосудов к нейронам из-за экспрессии 11-βHSD в ГЭБ [45]. Негативная регуляция ГК экспрессии ГР

была широко продемонстрирована [46]. Более высокая экспрессия ГР в нейронах, чем в астроцитах, может быть связана с высоким уровнем ГК в сосудах и астроцитах и более низким уровнем в нейронах. Такое распределение ГР говорит о том, что именно нейроны, а не астроглия новорожденных крыс могут быть наиболее чувствительными к ГК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые установлена колокализация ГР с маркерами клеточных типов в области CA1 и энторинальной коре неонатальных крыс. Результаты указывают на то, что ГР преимущественно колокализовался с нейрональными маркерами, чем с маркером астроцитарных клеток в переднем мозге новорожденных крыс, а, следовательно, именно нейроны, а не астроглия могут быть особенно уязвимы при лечении новорожденных DEX.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЦКП микроскопического анализа ИЦиГ СО РАН, где были получены конфокальные изображения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены, были разрешены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН (протокол № 19 от 26.11.2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yudit M.R. and Cidlowski J.A. // Mol. Endocrin. 2002. V. 16. P. 1719–1726.
2. Tronche F., Kellendonk C., Kretz O., Gass P., Anlag K., Orban P.C., Bock R., Klein R., and Schütz G. // Nat Genet. 1999. V. 23. P. 99–103.
3. Kellendonk C., Tronche F., Reichardt H.M., and Schütz G. // J. Ster. Biochem. Mol. Biol. 1999. V. 69. P. 253–259.
4. Kellendonk C., Gass P., Kretz O., Schütz G., and Tronche F. // Brain Res Bull. 2002. V. 57. P. 73–83.
5. Doyle L.W., Ehrenkrantz R.A., and Halliday H.L. // The Coch. Collab., ed., (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014), p. CD001145.pub3.

6. *Halliday H.L., Ehrenkranz R.A., and Doyle L.W.* // The Coch. Collab., ed., (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009), p. CD001146.pub2.
7. *Nguon. K., Baxter M.G., and Sajdel-Sulkowska E.M.* // The Cerebell. 2005. V. 4. P. 112–122.
8. *Bhatt A.J., Feng Y., Wang J., Famuyide M., and Hersey K.* // J. of Neurosci. Res. 2013. V. 91. P. 1191–1202.
9. *Holson R.R., Gough B., Sullivan P., Badger T., and Sheehan D.M.* // Neurotoxicology and Teratology. 1995. V. 17. P. 393–401.
10. *Hossain A., Hajman K., Charitidi K., Erhardt S., Zimmermann U., Knipper M., and Canlon B.* // Endocrin. 2008. V. 149. P. 6356–6365.
11. *Nagano M., Ozawa H., and Suzuki H.* // Neurosc. Res. 2008. V. 60. P. 364–371.
12. *Aronsson M., Fuxe K., Dong Y., Agnati L.F., Okret S., and Gustafsson J.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 9331–9335.
13. *Ábrahám I., Juhász G., Kékesi K.A., and Kovács K.J.* // Brain Res. 1996. V. 733. P. 56–63.
14. *Takeda A., Suzuki M., Tamano H., Takada S., Ide K., and Oku N.* // Neuroch. Intl. 2012. V. 60. P. 394–399.
15. *Zinchuk V. and Grossenbacher-Zinchuk O.* // CP Cell Biol. 2014. V. 62.
16. *Zinchuk V. and Grossenbacher-Zinchuk O.* // CP Cell Biol. 2011. V. 52.
17. *Adler J. and Parmryd I.* // PLoS ONE. 2014. V. 9. P. e111983.
18. *Adler J. and Parmryd I.* // Cyt. Pt A. 2010. V. 77A. P. 733–742.
19. *Dunn K.W., Kamocka M.M., and McDonald J.H.* // Am. J. of Phys.-Cell Phys. 2011. V. 300. P. C723–C742.
20. *Varga J., Ferenczi S., Kovács K.J., Garafova A., Jezova D., and Zelena D.* // PLoS ONE. 2013. V. 8. P. e72313.
21. *Bohn M.C., Dean D., Hussain S., and Giuliano R.* // Dev. Brain Res. 1994. V. 77. P. 157–162.
22. *Tsiarli M.A., Paula Monaghan A., and DeFranco D.B.* // Brain Res. 2013. V. 1523. P. 10–27.
23. *Vernocchi S., Battello N., Schmitz S., Revets D., Billing A.M., Turner J.D., and Muller C.P.* // Mol. & Cell. Prot. 2013. V. 12. P. 1764–1779.
24. *Gutiérrez-Mecinas M., Trollope A.F., Collins A., Morfett H., Hesketh S.A., Kersanté F., and Reul J.M.H.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 13806–13811.
25. *Papadopoulos A., Chandramohan Y., Collins A., Droste S.K., Nutt D.J., and Reul J.M.H.M.* // Eur. Neuropsych. 2011. V. 21. P. 316–324.
26. *Trollope A.F., Gutiérrez-Mecinas M., Mifsud K.R., Collins A., Saunderson E.A., and Reul J.M.H.M.* // Exp. Neurol. 2012. V. 233. P. 3–11.
27. *Ben-Ari Y.* // Nat Rev Neurosci. 2002. V. 3. P. 728–739.
28. *Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., and Dygalo N.N.* // Neur. of Dis. 2016. V. 91. P. 1–9.
29. *Britanova O., Akopov S., Lukyanov S., Gruss P., and Tarabykin V.* // Eur J of Neurosc. 2005. V. 21. P. 658–668.
30. *Baranek C., Dittrich M., Parthasarathy S., Bonnon C.G., Britanova O., Lanshakov D., Boukhtouche F., Sommer J.E., Colmenares C., Tarabykin V., and Atanasoski S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 3546–3551.
31. *Alcamo E.A., Chirivella L., Dautzenberg M., Dobrev G., Farinas I., Grosschedl R., and McConnell S.K.* // Neur. 2008. V. 57. P. 364–377.
32. *Britanova O., De Juan Romero C., Cheung A., Kwan K.Y., Schwark M., Gyorgy A., Vogel T., Akopov S., Mitkovski M., Agoston D., Šestan N., Molnár Z., and Tarabykin V.* // Neur. 2008. V. 57. P. 378–392.
33. *Bae E.-J., Lee H.-S., Park C.-H., and Lee S.-H.* // FEBS Let. 2009. V. 583. P. 1505–1510.
34. *Perlmann T. and Wallén-Mackenzie Å.* // Cell Tissue Res. 2004. V. 318. P. 45–52.
35. *Hoerder-Suabedissen A., Oeschger F.M., Krishnan M.L., Belgard T.G., Wang W.Z., Lee S., Webber C., Petretto E., Edwards A.D., and Molnár Z.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 3555–3560.
36. *Hoerder-Suabedissen A. and Molnár Z.* // Cereb. Cort. 2013. V. 23. P. 1473–1483.
37. *Oeschger F.M., Wang W.-Z., Lee S., García-Moreno F., Goffinet A.M., Arbonés M.L., Rakic S., and Molnár Z.* // Cereb. Cort. 2012. V. 22. P. 1343–1359.
38. *Tolner E.A., Sheikh A., Yukin A.Y., Kaila K., and Kanold P.O.* // J. Neurosci. 2012. V. 32. P. 692–702.
39. *Viswanathan S., Bandyopadhyay S., Kao J.P.Y., and Kanold P.O.* // J. Neurosci. 2012. V. 32. P. 1589–1601.
40. *Friauf E., McConnell S., and Shatz C.* // J. Neurosci. 1990. V. 10. P. 2601–2613.
41. *McConnell S., Ghosh A., and Shatz C.* // J. Neurosci. 1994. V. 14. P. 1892–1907.
42. *McConnell S.K., Ghosh A., and Shatz C.J.* // Sci. 1989. V. 245. P. 978–982.
43. *Wang Z., Benoit G., Liu J., Prasad S., Aarnisalo P., Liu X., Xu H., Walker N.P.C., and Perlmann T.* // Nat. 2003. V. 423. P. 555–560.
44. *Yu S., Yang S., Holsboer F., Sousa N., and Almeida O.F.X.* // PLoS ONE. 2011. V. 6. P. e22419.
45. *Wyrwoll C.S., Holmes M.C., and Seckl J.R.* // Front in Neuroendo. 2011. V. 32. P. 265–286.
46. *Rosewicz S., McDonald A.R., Maddux B.A., Goldfine I.D., Miesfeld R.L., and Logsdon C.D.* // J. of Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 2581–2584.

Glucocorticoid Receptor Expression in the Different Cell Types of the Neonatal Rat Hippocampus and Cortex

D. A. Lanshakov^{1, 2}, U. S. Drozd^{1, 2}, and N. N. Dygalo^{2, 3}

¹*Postgenomics Neurobiology Sector, The Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³*Functional Neurogenomics Laboratory, The Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Glucocorticoids (GC) are crucial regulator of organism homeostasis and function. Despite severe outcome glucocorticoid therapy in neonates is widely used antenatally for accelerating fetal lung maturation in cases of preterm birth. GC action mediated via glucocorticoid receptors – ligand activated transcription factors. Despite broad range of information concerning GR expression in the brain, not so much known about GR expression in the neonatal brain in aspects of cell specificity and identity. In this work we perform comparative study of GR expression together with panel of main neuronal and astrocytic cell markers in the neonatal rat brain. We immunohistochemically studied GR expression in the hippocampal CA1 field and enthorinal cortex together with cortical projection neuron markers – SATB2, NURR1; Calretenin – interneurons marker, and GFAP – astrocytic marker. The highest colocalization coefficients observed for GR with Calrtetenin. With projection neuron markers that are also transcription factors colocalization coefficients increased to the same values as for GR-Calretenin 6h after dexamethasone injection and GR were translocated to the nucleus. Our analysis showed that in the neonatal rat brain GR are more localized in neurons than in astocytes.

Keywords: glucocorticoid receptor; cell type markers, development, hippocampus, neocortex

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ФЕРМЕНТА СИНТЕЗА СЕРТОНИНА ПАРАХЛОРФЕНИЛАЛАНИНА НА ДОФАМИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА МЫШЕЙ КАТАЛЕПТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ

© 2024 г. Д. В. Базовкина¹, *, Е. Ю. Баженова¹, А. В. Куликов¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: daryabazovkina@gmail.com

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 12.07.2024 г.

Принята к публикации 13.07.2024 г.

В данной работе были изучены эффекты введения парахлорфенилаланина (ПХФА), ингибитора ключевого фермента синтеза серотонина, на выраженность реакции замирания и дофаминовую систему мозга у мышей линии CBA/Lac с наследственной предрасположенностью к каталепсии. Введение ПХФА (300 мг/кг/день, 3 дня) не повлияло на длительность каталептического замирания. В то же время содержание дофамина снизилось в гипоталамусе, среднем мозге и повысилось в стриатуме и прилежащих ядрах после введения ПХФА. Введение препарата не повлияло на уровни ДОФУК и ГВК, метаболитов дофамина, в исследованных структурах мозга. Кроме этого, было обнаружено ПХФА-индуцированное повышение уровня мРНК гена DRD2-рецептора в среднем мозге и гена катехол-О-метилтрансферазы в гипоталамусе и среднем мозге. При этом не было найдено влияния ПХФА на экспрессию гена DRD1-рецептора и гена фермента синтеза дофамина тирозингидроксилазы в мозге. Таким образом, ингибирование ключевого фермента синтеза 5-НТ оказало значительное влияние на ДА систему мозга мышей линии CBA/Lac, при этом наибольшие изменения были обнаружены в среднем мозге и гипоталамусе.

Ключевые слова: триптофангидроксилаза, парахлорфенилаланин, серотонин, дофамин, рецепторы, мозг, каталепсия, мышь

DOI: 10.31857/S1027813324030063, EDN: EQFXXJ

Принятые сокращения: 5-НТ – серотонин, ДА – дофамин, 5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, ТПГ – триптофангидроксилаза, КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза.

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) играет роль ключевого нейромедиатора в ЦНС и функционирует как гормон на периферии. 5-НТ система мозга представляет собой важный фактор нейропластичности в силу своей экспансивности и вовлечения в регуляцию самых разнообразных форм поведения и нейроэндокринных процессов [1, 2]. Развитие таких психопатологий, как шизофрения, депрессия и тревожность, нередко ассоциировано с дефицитом серотонинергической нейротрансмиссии [3]. 5-НТ синтезируется из незаменимой аминокислоты – L-триптофана; ключевым ферментом синтеза 5-НТ в мозге является триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2), которая гидроксилирует L-триптофан до 5-гидрокси-триптофана (5-НТР) [4].

Другой важной моноаминергической нейромедиаторной системой является дофаминовая (ДА) система мозга, которая также участвует в регуляции различных физиологических процессов и разнообразных типов поведения [5, 6]. Дофамин играет важную роль в патогенезе нейродегенеративных и психических расстройств, таких как депрессия, болезни Паркинсона и Альцгеймера [5, 7]. Дофаминовые рецепторы (D1–D5) являются трансмембранными G-белок-связанными клеточными рецепторами. Наибольшее внимание исследователей привлекают рецепторы D1 и D2, которые вовлечены в регуляцию широкого спектра поведенческих реакций [6]. Следует отметить, что 5-НТ и ДА нейромедиаторные системы находятся в тесном взаимодействии, которое, в свою очередь, влияет на регуляцию поведения в норме и патологии [8, 9].

Каталепсия или реакция замирания — это состояние выраженной неподвижности, в чрезмерной форме у пациентов она является синдромом, например, шизофрении, болезни Паркинсона [10, 11]. Каталепсию можно вызвать у мышей, ушипнув животное за загривок. Однако такая индуцированная

щипком каталепсия — очень редкое явление, которое не встречается у мышей наиболее распространенных инбредных линий, таких как BALB/c, C57BL/6J или DBA/2. Ранее нами было обнаружено, что мыши линии CBA/Lac предрасположены к щипковой реакции замирания [12]. Было показано участие 5-НТ системы мозга в регуляции наследственной каталепсии у мышей. Так, мыши линии CBA/Lac отличались повышенной активностью ТПГ-2 и сниженной плотностью 5-НТ_{2A} серотониновых рецепторов в стриатуме по сравнению с мышами некаталептических линий [13]. Примечательно, что не было показано существенного вклада ДА системы мозга в регуляцию наследственной каталепсии [14], хотя в литературе хорошо описан феномен галоперидоловой каталепсии, вызываемой фармакологической блокадой дофаминовых рецепторов D₂ [15]. Остается неясным, как дефицит 5-НТ в мозге может повлиять на выраженность щипковой каталепсии и состояние ДА нейромедиаторной системы.

Целью работы было исследование эффектов ингибирования синтеза 5-НТ на длительность каталептического замирания и дофаминовую систему мозга у мышей линии CBA/Lac с генетической предрасположенностью к каталепсии. Для этого было изучено влияние введения ингибитора фермента синтеза серотонина парахлорфенилаланина на а) поведение в тесте щипковой каталепсии; б) содержание ДА и его метаболитов ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусная кислота) и ГВК (гомованилиновая кислота) в структурах мозга; в) уровни мРНК генов, кодирующих ключевые элементы ДА системы, в структурах мозга мышей линии CBA/Lac.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Опыты проводили на взрослых (10–12 недель) самцах мышей линий CBA/Lac (CBA (n=20)). Вес животных составлял 24±0.8 г, мыши содержались в пластиковых клетках размером 40 × 30 × 15 см в стандартных условиях (температура 20–22°C, относительная влажность 50–60%, с регулируемым световым режимом (14 ч света и 10 ч темноты), со свободным доступом к стандартной пище и воде). Исследование было выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН (RFMEFI62119X0023). Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996) и приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 119н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” (зарегистрирован 15.08.2016 № 43232).

Дизайн эксперимента. Животные были разделены на две группы по 10 особей. Мышам первой группы вводили парахлорфенилаланин (ПХФА, (R)-2-amino-3-phenylpropionic acid) (Merck, Darmstadt, Germany) в дозе 300 мг/кг в течение трех дней. Выбор дозы препарата и времени его действия основывался на наших ранних исследованиях [16] и литературных данных, согласно которым снижение уровня серотонина, вызванное ПХФА, достигает максимума через 3 дня и сохраняется в течение недели [17]. Мышам второй (контрольной) группы вводили физиологический раствор. На третий день (за сутки до тестирования поведения) мышей рассаживали в индивидуальные клетки, чтобы исключить проявление групповых эффектов [18]. На четвертый день эксперимента у мышей оценивали продолжительность каталептического замирания. На пятый день эксперимента животных декапитировали, выделяли на льду гипоталамус, черную субстанцию, средний мозг, область прилежащих ядер и стриатум. Выбор структур был обусловлен тем, что основные пути дофаминовой системы мозга включают вышеназванные отделы [5]. Образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C до дальнейших процедур.

Тест щипковой каталепсии. Длительность замирания оценивали по методике, описанной ранее [19]. Каталепсию вызывали щипком загривка в течение 5 с, после чего мышью помещали на две перекладки, расположенные параллельно под углом 45° на расстоянии 5 см одна от другой и на высоте 25 см от поверхности стола. Регистрировали продолжительность замирания — время, в течение которого мышью сохраняла неподвижность. Время теста ограничивали 120 с, после чего животное возвращали в клетку и через 1–2 мин повторяли тестирование. Для каждой мыши проводили 10 тестов. Выраженность каталепсии оценивали по средней длительности замирания (с) трех тестов с наибольшими значениями времени замирания [19].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для выделения общей РНК и ВЭЖХ использовали метод множественного выделения. Для этого структуры гомогенизировали в объеме (гипоталамус, черную субстанцию, область прилежащих ядер — в 150 мкл, стриатум и средний мозг — в 250 мкл) холодного 50 мМ Tris HCl буфера (pH 7.6) на льду, затем аликвоты гомогената использовали для выделения общей РНК (по 100 мкл для гипоталамуса, черной субстанции, области прилежащих ядер и по 200 мкл для стриатума и среднего мозга) и ВЭЖХ (50 мкл). Аликвоту для ВЭЖХ (50 мкл) быстро переносили в эппендорф с 150 мкл 0.6 М хлорной кислоты (HClO₄). В оставшуюся аликвоту (100 мкл или 200 мкл) быстро добавляли TRIzol Reagent (“Lifetechnologies”, USA), вся процедура занимала меньше минуты.

Методом ВЭЖХ определяли содержание дофамина, ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусная кислота) и ГВК (гомованилиновая кислота) в структурах мозга по протоколу, описанному ранее [20]. После добавления аликвоты гомогената ткани мозга (50 мкл) в эппендорф с 150 мкл 0.6 М хлорной кислоты (HClO_4), пипетировали и центрифугировали 15 минут при 4°C и 14000 об/мин для осаждения белка. Отбирали супернатант и разбавляли *milliQ* водой в 2 раза. Оставшийся осадок хранили при -20°C для последующего определения белка методом Бредфорда. Для этого осадок растворяли в 1 мл 0.1М гидроксида натрия (NaOH), концентрацию белка в полученном растворе определяли с помощью реактива Бредфорда в двух повторах для каждого образца. Измерение концентрации белка проводили с помощью спектрофотометра MultiScan GO и программного обеспечения Thermo Scientific SkanIt (Thermo Fisher Inc., США). Двадцать мкл супернатанта вводили в петлю системы ВЭЖХ, которая состояла из следующих компонентов: электрохимический детектор (750 мВ, DECADE ИТМ; Antec, Нидерланды), проточный элемент из стеклоглассера (ячейка VT-03, 3 мм GC sb; Antec, Нидерланды), системный контроллер СВМ-20А, блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20А и дегазатор DGU-20A5R (Shimadzu Corporation, США). Хроматографическое разделение веществ осуществляли в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0.6 мл/мин на колонке C18 (размер частиц 5 мкм, $L \times ID$ 75 \times 4.6 мм, Luna, Phenomenex, США), защищенной предколонкой C8 (Phenomenex, США). Подвижная фаза состояла из 87% буфера, содержащего 50 мМ дигидроортофосфата калия (Sigma Aldrich, США), 1.4 мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты (Chimed, Россия) и 0.05 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma Aldrich, США) pH 3.9, и 13% метанола (Chimed, Россия). Для построения калибровочной кривой внешних стандартов использовали серию растворов, содержащих по 0.5 или 1 или 2 нг дофамина, ДОФУК и ГВК (Sigma Aldrich, США). Площадь пиков была оценена при помощи программы LabSolution LG/GC (Shimadzu, США) и калибрована на соответствующий внешний стандарт. Концентрации биогенных аминов выражали в нг/мг белка, как было описано ранее [20].

Выделение общей РНК. Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent (“Lifetechnologies”, USA), затем обработана ДНКазой без РНКазной активности (RNase free DNase, Promega, США, 1000 о.е./мл) в соответствии с инструкциями производителей. Оптическая плотность РНК была измерена на спектрофотометре (Nanodrop, США). РНК была разведена водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранилась при -70°C .

Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [21, 22].

Реакция обратной транскрипции. Реакцию проводили по протоколу, описанному ранее [21, 22]. Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана с 8 мкл смеси, содержащей 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ), 5.65 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом и 2.25 мкл стерильного 1М KCl, денатурирована при 94°C в течение 5 мин на амплификаторе БИС М-120 (БИС-Н, Россия), затем добавляли 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу MuMLV (Биосан, Россия) (2000 ед.), 0.5 М Tris-HCl (pH 8.3, 0.63 мкл), смесь трифосфатов 4 мМ (3.63 мкл), дитиотреитол 0.1 М (2.25 мкл), 0.1 М MnCl_2 (0.3 мкл) и 8 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом. Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при 41°C в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре -20°C .

ОТ-ПЦР в реальном времени. Экспрессию генов определяли с помощью количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), разработанного в нашей лаборатории [21, 22]. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разрабатывали на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, при помощи инструментов Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) и синтезировали в компании “Биосан” (Новосибирск, Россия). Для проведения ПЦР в реальном времени 1 мкл кДНК смешивали с универсальным набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (R-402, Синтол, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche Applied Science, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 95°C , 1 цикл; 10 с при 95°C , 30 с при соответствующей температуре отжига (табл. 1), 30 с при 72°C , 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировали в отдельных пробирках (одновременно с образцами кДНК) и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах C_t (значение порогового цикла) – $\lg P$ (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480. Для контроля специфичности амплификации использовали анализ кривой плавления ПЦР-продукта для каждого прогона каждой пары праймеров. Экспрессия

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж.}, ^\circ\text{C}$	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Polr2a</i>	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaatttgcgtagt-3'	60	194
<i>Drd1</i>	F 5'-ggaaaccctgtcgaatgctctc-3' R 5'-ccagccaaccacacaatacatcg-3'	64	222
<i>Drd2</i>	F 5'-tccgccacttcttgacatacattg-3' R 5'-cccattccacagcctctctaag-3'	65	203
<i>Comt</i>	F 5'-gacttctctggcgtatgtgag-3' R 5'-agagtgagtgtgtcatcg-3'	60	199
<i>Th</i>	F 5'-ccgtacaccctggccattgatg-3' R 5'-atgaaggccagggaatgcagg-3'	64	320

каждого исследуемого гена была представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*Polr2a*), выполняющей функцию внутреннего стандарта [21, 22].

Статистика. Результаты представляли как $m \pm \text{SEM}$ и сравнивали в программе STATISTICA 8.0 с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Нормальность выборок определяли по критерию Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерию Шапиро-Уилка. Достоверными считались различия с $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поведение. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил эффекта ПХФА на продолжительность каталептического замирания ($t_{18}=1.39$, $p > 0.05$). Среднее время неподвижности составило 28.1 ± 6.0 с для контрольной группы и 37.6 ± 3.2 с для группы ПХФА.

Содержание серотонина в структурах мозга. Для подтверждения эффективности ингибирования синтеза 5-НТ путем введения ПХФА были изучены уровни этого нейромедиатора в мозге. Результаты однофакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 2. ПХФА привел к значительному падению содержания 5-НТ во всех исследуемых структурах мозга.

Метаболизм дофамина в структурах мозга. Уровень ДА снизился в гипоталамусе ($t_{18}=3.36$, $p < 0.01$) и среднем мозге ($t_{18} = 3.66$, $p < 0.01$) и повысился в стриатуме ($t_{18} = 3.33$, $p < 0.01$) и прилежащих ядрах ($t_{18} = 2.83$, $p < 0.05$) после трехдневного введения ПХФА. В то же время препарат не повлиял на содержание ДА в черной субстанции ($t_{18} = 0.18$, $p > 0.05$) (рис. 1а). Введение ПХФА не оказало эффекта на уровни метаболита ДОФУК в гипоталамусе ($t_{18} = 1.31$, $p > 0.05$), черной субстанции ($t_{18} = 1.14$, $p > 0.05$), среднем мозге ($t_{18} = 0.84$, $p > 0.05$), прилежащих ядрах ($t_{18} = 0.70$, $p > 0.05$) и стриатуме ($t_{18} = 1.52$, $p > 0.05$) (рис. 1б). Также

Таблица 2. Влияние введения параклорфенилаланина (ПХФА) на содержание серотонина в структурах мозга мышей линии СВА

Структура	Контроль	ПХФА	t, p
Гипоталамус	3.71 ± 0.13	1.53 ± 0.06	$t_{18} = 15.28$, $p < 0.001$
Черная субстанция	8.21 ± 0.47	3.43 ± 0.14	$t_{18} = 9.84$, $p < 0.001$
Средний мозг	18.14 ± 0.71	8.57 ± 0.32	$t_{18} = 12.29$, $p < 0.001$
Прилежащие ядра	2.23 ± 0.11	1.09 ± 0.04	$t_{18} = 10.19$, $p < 0.001$
Стриатум	2.91 ± 0.25	1.89 ± 0.18	$t_{18} = 3.27$, $p < 0.01$

Концентрация серотонина (нг/мг белка) представлена как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, N = 10 мышей в группе

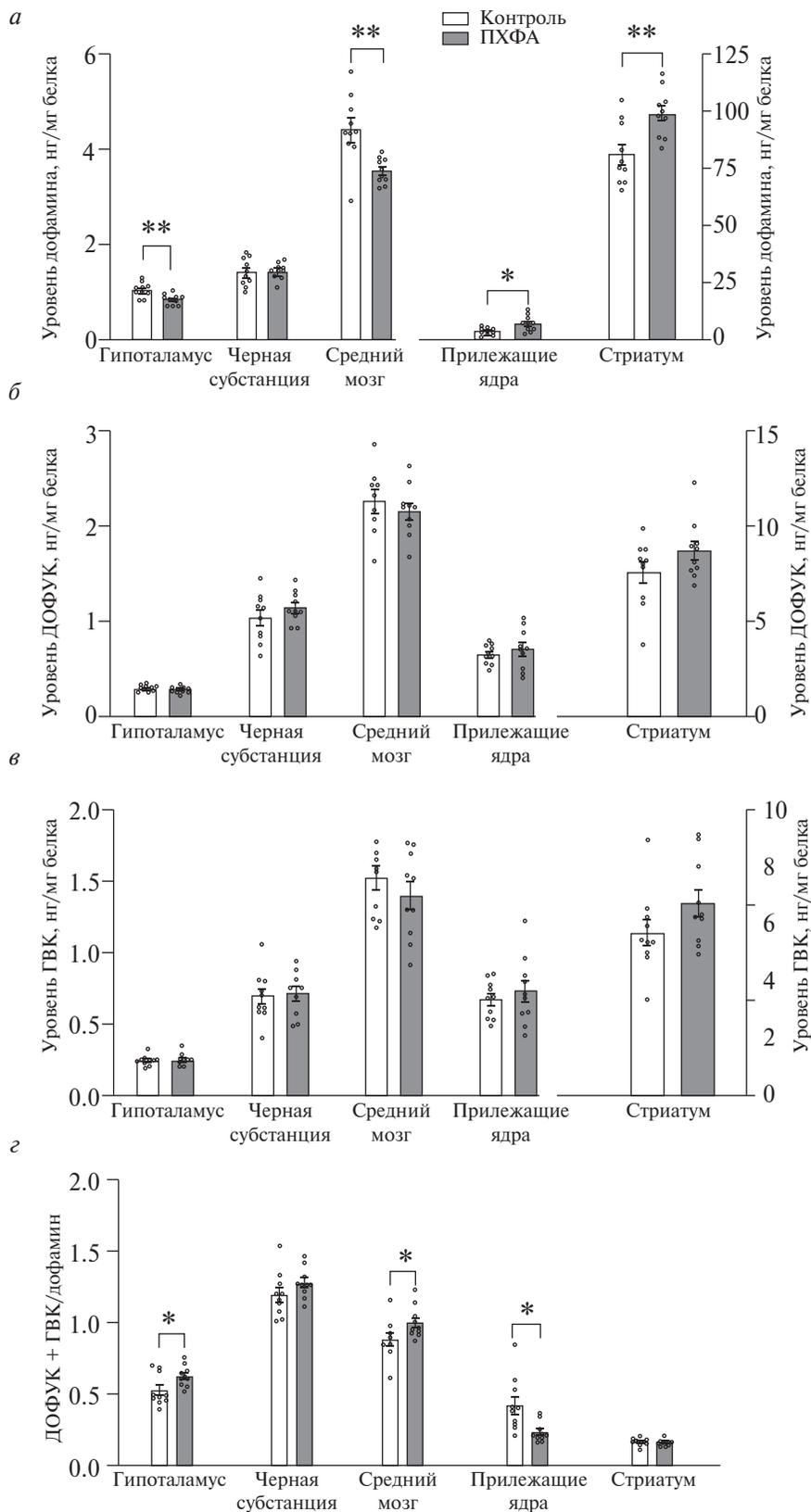


Рис. 1. Влияние введения параклорфенилаланина (300 мг/кг, 3 дня) на уровни дофамина (а), его метаболитов ДОФУК (б), НВА (в) и индекс метаболизма дофамина (ДОФУК+ГВК/дофамин) (г) в структурах мозга мышей линии СВА. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. N = 10 животных в группе.

препарат не оказал влияния на уровни метаболита ГVK в гипоталамусе ($t_{18} = 0.48, p > 0.05$), черной субстанции ($t_{18} = 0.32, p > 0.05$), среднем мозге

($t_{18} = 1.09, p > 0.05$), прилежащих ядрах ($t_{18} = 0.79, p > 0.05$) и стриатуме ($t_{18} = 1.55, p > 0.05$) (рис. 1б). Индекс метаболизма дофамина, определяемый как

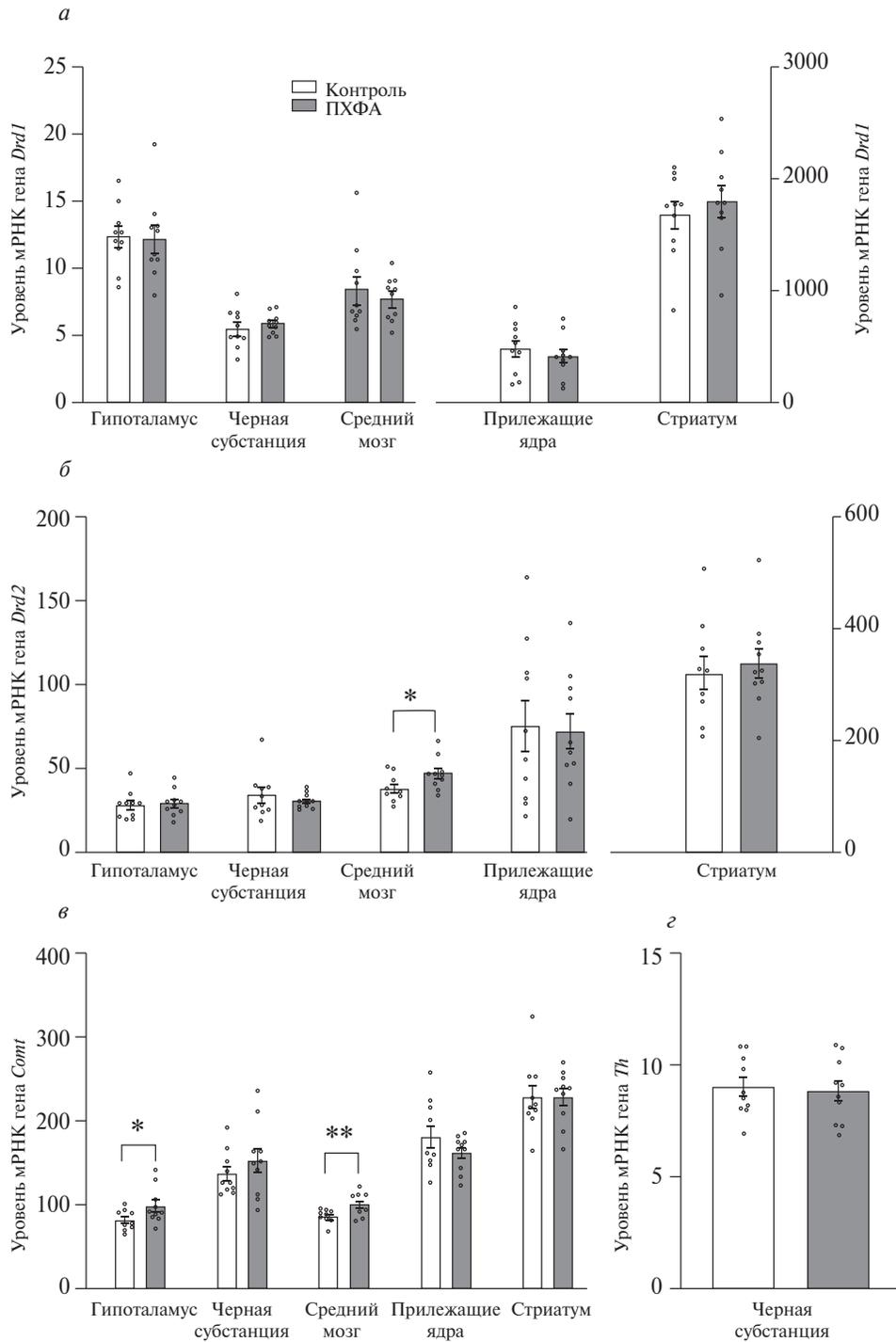


Рис. 2. Влияние введения парахлорфенилаланина (300 мг/кг, 3 дня) на экспрессию генов дофаминовых рецепторов *Drd1* (а), *Drd2* (б), гена катехол-О-метилтрансферазы *Comt* (фермента метаболизма дофамина) (в) и гена тирозин-гидроксилазы *Th* (фермента синтеза дофамина) (г) в структурах мозга мышей линии СВА. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *Polr2a*.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. N = 10 животных в группе.

отношение ДОФУК+ГВК/дофамин, был выше для гипоталамуса ($t_{18} = 2.29$, $p < 0.05$), среднего мозга ($t_{18} = 2.19$, $p < 0.05$) и ниже для области прилежащих ядер ($t_{18} = 2.80$, $p < 0.05$) у мышей, получавших ПХФА по сравнению с контролем. В то же время этот показатель статистически не различался у обеих групп для черной субстанции ($t_{18} = 1.07$, $p > 0.05$) и стриатума ($t_{18} = 0.69$, $p > 0.05$) (рис. 1з).

Экспрессия генов в структурах мозга. Введение ПХФА не оказало действия на уровни мРНК гена *Drd1*, кодирующего дофаминовый рецептор D1, в гипоталамусе ($t_{18} = 0.08$, $p > 0.05$), черной субстанции ($t_{18} = 0.67$, $p > 0.05$), среднем мозге ($t_{18} = 0.61$, $p > 0.05$), прилежащих ядрах ($t_{18} = 0.48$, $p > 0.05$) и стриатуме ($t_{18} = 0.65$, $p > 0.05$) (рис. 2а). Также препарат не повлиял на уровни мРНК гена *Drd2*, кодирующего дофаминовый рецептор D2, в гипоталамусе ($t_{18} = 0.33$, $p > 0.05$), черной субстанции ($t_{18} = 0.77$, $p > 0.05$), прилежащих ядрах ($t_{18} = 0.18$, $p > 0.05$) и стриатуме ($t_{18} = 0.45$, $p > 0.05$) (рис. 2а). Однако введение ПХФА привело к повышению экспрессии гена *Drd2* в среднем мозге ($t_{18} = 2.22$, $p < 0.05$) (рис. 2б). Уровни мРНК гена *Comt*, кодирующего фермент деградации дофамина КОМТ, увеличились в гипоталамусе ($t_{18} = 2.27$, $p < 0.05$) и среднем мозге ($t_{18} = 2.93$, $p < 0.01$) под действием ПХФА. В то же время препарат не оказал эффекта на экспрессию этого гена в черной субстанции ($t_{18} = 0.97$, $p > 0.05$), прилежащих ядрах ($t_{18} = 1.33$, $p > 0.05$) и стриатуме ($t_{18} = 0.04$, $p > 0.05$) (рис. 2в). Кроме этого, уровни мРНК гена *Th*, кодирующего фермент синтеза дофамина тирозингидроксилазу, в черной субстанции не различались между группами мышей ($t_{18} = 0.31$, $p > 0.05$) (рис. 2г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе впервые было проведено комплексное исследование эффектов ингибирования синтеза серотонина на время каталептического замирания и дофаминовую систему мозга у мышей линии СВА. Что касается подавления синтеза 5-НТ в ЦНС, то согласно одним данным, оно приводит к усилению ДА нейротрансмиссии в мозге крыс [23], но другие авторы сообщают об отсутствии влияния ингибирования центрального 5-НТ на метаболизм ДА в структурах мозга мышей линий BALB/c и C57BL/6J [24]. В нашей работе содержание ДА снизилось в гипоталамусе, среднем мозге и повысилось в стриатуме и прилежащих ядрах у мышей СВА после введения ПХФА, при этом препарат не повлиял на уровни метаболитов дофамина ДОФУК и ГВК ни в одной из исследованных структурах мозга. Эти результаты в совокупности с данными литературы могут свидетельствовать о значительном влиянии генотипа на 5-НТ/ДА взаимодействие в ЦНС.

ДА нейроны вентральной области покрышки (ventral tegmental area, VTA) среднего мозга посылают проекции к области прилежащих ядер по мезолимбическому пути [25]. Серотониновые рецепторы 5-НТ₂A и 5-НТ₂C вентральной области покрышки представляют особый интерес, поскольку их фармакологическая активация, соответственно, стимулирует и подавляет активность ДА нейронов в этом отделе и высвобождение ДА в прилежащем ядре [26, 27]. Таким образом, изменения ДА системы в мозге мышей СВА после введения ПХФА могут быть связаны с активацией 5-НТ₂A-рецепторов (по компенсаторному механизму в ответ на подавление центрального 5-НТ), а также стимулирующим действием 5-НТ₂A-рецепторов на ДА нейроны в VTA, что приводит к снижению содержания ДА в среднем мозге и его высвобождению в области прилежащих ядер. Однако эта гипотеза требует дополнительного экспериментального подтверждения. В то же время, это предположение согласуется с данными о том, что СИОЗС (ингибиторы обратного захвата 5-НТ), которые повышают внеклеточные уровни 5-НТ в VTA, могут вызвать небольшое снижение возбудимости ДА нейронов в этом отделе мозга [28]. Известно, что ауторецепторы D₂ в VTA тонически ингибируют высвобождение дофамина в этой структуре [29], что согласуется с результатами настоящей работы, демонстрирующими повышение экспрессии рецепторов D₂ и снижение ДА в среднем мозге мышей СВА, получавших ПХФА.

Известно, что ДА нейроны черной субстанции посылают аксоны в стриатум, образуя нигростриарный дофаминергический путь [25]. В нашей работе введение ПХФА привело к росту уровня ДА в стриатуме, не оказав при этом влияния на содержание этого нейромедиатора и его метаболитов в черной субстанции. Есть данные, демонстрирующие возможность синтеза ДА недофаминергическими нейронами в стриатуме у мышей, как в норме, так и при нарушениях иннервации этой структуры. Считается, что такой синтез ДА недофаминергическими нейронами является важным механизмом нейропластичности, способствующим компенсации дефицита ДА при дегенерации нигростриатных ДА нейронов [30]. Можно предположить, что в нашей работе значительное увеличение ДА в стриатуме, индуцированное ингибированием центрального 5-НТ и наблюдаемое при отсутствии изменений ДА иннервации в черной субстанции, обусловлено синтезом ДА недофаминергическими нейронами. Однако для подтверждения этой гипотезы требуется дополнительное исследование.

Гипоталамус является частью ДА тубероинфундибулярного пути, отвечающего за регуляцию гормональной секреции [5], причем синтез ДА происходит в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса [31]. В нашей работе введение ПХФА привело

к падению содержания дофамина и повышению экспрессии гена *Comt* (фермента деградации ДА) в гипоталамусе. Этот результат согласуется с данными литературы о том, что введение ПХФА приводит к дисфункции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [32, 33].

Ранее было показано участие 5-НТ системы мозга в регуляции наследственной каталепсии. С одной стороны, мыши линии СВА демонстрировали повышенную активность ключевого фермента синтеза 5-НТ ТППГ-2 в стриатуме, по сравнению с мышами других некаталептических инбредных линий [13], поэтому введение ТППГ2 могло бы привести к снижению времени замирания. С другой стороны, острое введение агонистов 5-НТ1А- и 5-НТ2А-рецепторов подавляло выраженность каталепсии у мышей линий СВА [34, 35], а длительное введение ингибиторов обратного захвата 5-НТ приводило к снижению длительности замирания у мышей каталептической линии ASC, родственной линии СВА [36]. Эти факты позволяют предполагать скорее прокаталептический эффект ПХФА. Однако в нашей работе трехдневное введение ПХФА, обусловившее значительное снижение уровня 5-НТ во всех исследованных структурах мозга, не оказало действия на длительность каталептического замирания.

Известно, что каталепсия, вызванная введением галоперидола, развивается вследствие дефицита дофаминергической иннервации, обусловленной блокадой D2-рецепторов нигростриарного пути [37]. В нашей работе мы обнаружили, что введение ПХФА приводит к повышению уровня ДА в стриатуме. Вероятно, индуцированный ПХФА рост уровня ДА в стриатуме может “компенсировать” возможное прокаталептическое влияние ингибирования ТППГ-2. Это предположение, конечно же, требует дополнительного экспериментального подтверждения.

Также следует отметить, что в развитие каталептического замирания могут быть вовлечены другие медиаторные системы. Так, у лабораторных грызунов каталепсию можно вызвать введением, например, морфина или его производных [38], 9-тетрагидроканнабинола [39], холиномиметиков или агонистов ГАМК-А и ГАМК-Б рецепторов [40]. В литературе есть данные, демонстрирующие влияние введения ПХФА на эндоканнабиноидную систему и ГАМК в ЦНС [41, 42]. Следовательно, эти системы могут также участвовать в регуляции каталептического замирания у мышей, получавших ПХФА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ингибирование ключевого фермента синтеза 5-НТ оказало значительное влияние на ДА систему мозга мышей линии СВА/Lac, как на уровне метаболизма нейромедиатора, так

и экспрессии ключевых генов ДА системы мозга. При этом наибольшие изменения были обнаружены в среднем мозге, структуре, где происходит основной синтез 5-НТ, и гипоталамусе, структуре, вовлеченной в регуляцию гормональной секреции. Результаты демонстрируют, что линия СВА/Lac является перспективной моделью для изучения взаимодействия 5-НТ и ДА нейромедиаторных систем.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00078). Разведение инбредной линии мышей СВА/Lac было выполнено за счет средств бюджетного проекта FWNR-2022-0023.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996) и приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 119н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” (зарегистрирован 15.08.2016 № 43232). Условия содержания животных и проведенные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Вклад авторов. Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – концепция и руководство работой; Д.В. Базовкина, Е.Ю. Баженова – проведение экспериментов; Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – обсуждение результатов исследования; Д.В. Базовкина – написание текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kulikova E.A., Kulikov A.V.* // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2019. V. 23. P. 655–667.
2. *Toufexis D., Rivarola M.A., Lara H., Viau V.* // *J. Neuroendocrinol.* 2014. V. 26. P. 573–86.
3. *Kulikov A.V., Gainetdinov R.R., Ponimaskin E., Kalueff A., Naumenko V.S., Popova N.K.* // *Expert opinion on therapeutic targets.* 2018. V. 22. P. 319–330.
4. *Walther D.J., Bader M.* // *Biochem. Pharmacol.* 2003. V.66. P. 1673–1680.
5. *Baskerville T.A., Douglas A.J.* // *CNS Neurosci. Ther.* 2010. V. 16. P. e92–123.
6. *Beaulieu J.M., Espinoza S., Gainetdinov R.R.* // *Br. J. Pharmacol.* 2015. V. 172. P. 1–23.
7. *Grace A.A.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2016. V. 17. P. 524–532.
8. *Dellu-Hagedorn F., Fitoussi A., De Deurwaerdère P.* // *J. Neurosci. Methods.* 2017. V. 280. P. 54–63.

9. *Esposito E., Di Matteo V., Di Giovanni G.* // Prog. Brain Res. 2008. V. 172. P. 3–6.
10. *Daniels J.* // J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 2009. V. 21. P. 371–380.
11. *Cattarinussi G., Gugliotta A.A., Hirjak D., Wolf R.C., Sambataro F.* // Schizophr. Res. 2024. V. 263. P. 194–207.
12. *Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K.* // Genes Brain Behav. 2008. V. 7. P. 506–512.
13. *Popova N.K., Kulikov A.V.* // Am. J. Med. Genet. 1995. V. 60. P. 214–220.
14. *Скринская Ю.А., Попова Н.К., Никулина Е.М., Куликов А.В.* // Журн. высш. нерв. деят-сти. 1997. Т. 47. № 6. С. 1032–1039.
15. *Waku I., Magalhães M.S., Alves C.O., de Oliveira A.R.* // Eur. J. Neurosci. 2021. V. 53. P. 3743–3767.
16. *Куликова Е.А., Фурсенко Д.В., Баженова Е.Ю., Куликов А.В.* // Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 2. С. 313–320.
17. *Koe B.K., Weisman A.J.* // Pharmacol. Exp. Ther. 1966. V. 154. P. 499–516.
18. *Науменко Е.В., Попова Н.К., Старыгин А.Г.* // Журнал общей биологии. 1971. Т. 32. С. 731–736.
19. *Kulikov A.V., Kozlachkova E.Y., Maslova G.B., Popova N.K.* // Behav. Genet. 1993. V. 23. № 4. P. 379–384.
20. *Bazovkina D., Naumenko V., Bazhenova E., Kondaurova E.* // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Т. 22. № 21.
21. *Науменко В.С., Куликов А.В.* // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 1. С. 37–44.
22. *Naumenko V.S., Osipova D.V., Kulikov A.V., Kostina E.V.* // Journal of Neuroscience Methods. 2008. Т. 170. № 2. С. 197–203.
23. *Samanin R., Garattini S.* // Life Sci. 1975. V. 17. P. 1201–1209.
24. *Наркевич В.Б., Литвинова С.А., Роговский В.С., Цорин И.Б., Кудрин В.С.* // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 1. С. 59–66.
25. *Klein M.O., Battagello D.S., Cardoso A.R., Hauser D.N., Bittencourt J.C., Correa R.G.* // Cellular and molecular neurobiology. 2019. V. 39. P. 31–59.
26. *Di Giovanni G., Di Matteo V., Pierucci M., Benigno A., Esposito E.* // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. P. 3069–3081.
27. *Porras G., Di Matteo V., Fracasso C., Lucas G., De Deurwaerdere P., Caccia S., Esposito E., Spampinato U.* // Neuropsychopharmacology. 2002. V. 26. P. 311–324.
28. *Di Mascio M., Di Giovanni G., Di Matteo V., Prisco S., Esposito E.* // Brain Research Bulletin. 1998. V. 46. P. 547–554.
29. *Chen N.N., Pan W.H.* // J. Neurochem. 2000. V. 74. P. 2576–2582.
30. *Блохин В.Е., Пронина Т.С., Угрюмов М.В.* // Нейрохимия. 2020. Т. 37. № 1. С. 39–45.
31. *Gudelsky G.A.* // Psychoneuroendocrinology. 1981. V. 6. P. 3–16.
32. *Shi H.Y., Lu Y., Li Y.X., Tian F.Z.* // China Med. Her. 2018. V. 15. P. 33–36.
33. *Si Y., Wang L., Lan J., Li H., Guo T., Chen X., Dong C., Ouyang Z., Chen S.Q.* // Pharm. Biol. 2020. V. 58. P. 915–924.
34. *Базовкина Д.В., Теренина Е.Е., Куликов А.В.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 150. № 8. С. 190–193.
35. *Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Zubkov E.A., Kulikov A.V.* // Genes Brain Behavior. 2010. Т. 9. № 5. С. 519–524.
36. *Tikhonova M.A., Alperina E.L., Tolstikova T.G., Bazovkina D.V., Di V.Y., Idova G.V., Kulikov A.V., Popova N.K.* // Neurosci Behav Physiol. 2010. V. 40. P. 521–527.
37. *Waku I., Magalhães M.S., Alves C.O., de Oliveira A.R.* // The European journal of neuroscience. 2021. V. 53. P. 3743–3767.
38. *Tuerke K.J., Beninger R.J., Paquette J.J., Olmstead M.C.* // Behav Pharmacol. 2011. V. 22. P. 558–563.
39. *Moore C.F., Weerts E.M.* // Psychopharmacology (Berl). 2022. V. 239. P. 1397–1408.
40. *Klemm W.R.* // Prog Neurobiol. 1989. V. 32. P. 403–422.
41. *Li X., He C., Shen M., Wang M., Zhou J., Chen D., Zhang T., Pu Y.* // J Ethnopharmacol. 2024. V. 319. P. 117331.
42. *Liu Y.M., Li J.C., Gu Y.F., Qiu R.H., Huang J.Y., Xue R., Li S., Zhang Y., Zhang K., Zhang Y.Z.* // Neurochem Res. 2024. V. 49. P. 1150–1165.

Effect of Parachlorophenylalanine, an Inhibitor of the Serotonin Synthesis Enzyme, on the Brain Dopamine System of Cataleptic Mice

D. V. Bazovkina¹, E. Yu. Bazhenova¹, and A. V. Kulikov¹

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

This study examined the effects of administration of parachlorophenylalanine (PCPA), an inhibitor of the key enzyme serotonin synthesis, on the freezing immobility and dopamine brain system in CBA/Lac mice with a hereditary predisposition to catalepsy. Administration of PCPA (300 mg/kg/day, 3 days) did not affect the duration of cataleptic freezing. Whereas, dopamine content decreased in the hypothalamus and midbrain and increased in the striatum and nucleus accumbens of mice after PCPA treatment. The administration of the drug did not affect the levels of DOPAC and HVA (dopamine metabolites) in the all studied brain structures. In addition, a PCPA-induced increase in the mRNA level of DRD2 receptor gene in the midbrain and *Comt* (catechol-O-methyltransferase) gene in the hypothalamus and midbrain were found. However, no effect of PCPA on the expression of DRD1 receptor gene and Th (tyrosine hydroxylase, key enzyme dopamine synthesis) gene in the brain was found. Thus, inhibition of the key enzyme of 5-HT synthesis had a significant effect on the brain DA system of CBA/Lac mice, with the greatest changes being found in the midbrain and hypothalamus.

Keywords: tryptophanhydroxylase, parachlorophenylalanine, serotonin, dopamine, receptors, brain, catalepsy, mouse

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 612.821.6

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ХЛОРИДА МАРГАНЦА
НА МЕТАБОЛИЗМ СЕРОТОНИНА В МОЗГЕ И РЕГУЛИРУЕМОЕ
СЕРОТОНИНОМ ПОВЕДЕНИЕ РЫБ ВИДА *DANIO RERIO*

© 2024 г. А. Е. Изъюров¹, И. Е. Сорокин¹, В. С. Евсюкова¹, Д. А. Золотова¹, П. А. Куликов¹,
А. В. Куликов^{1, *}

¹ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: avkulikov52@gmail.com

Поступила в редакцию 19.06.2024 г.

После доработки 15.07.2024 г.

Принята к публикации 16.07.2024 г.

Ионы марганца токсичны для центральной нервной системы и вызывают нарушения моторики. Рыбы вида *Danio rerio* широко используют в исследованиях по нейробиологии, психофармакологии и токсикологии. Целью работы было изучение влияния длительного воздействия ионов Mn на серотониновую (5-НТ) систему головного мозга и контролируемые ею формы поведения у рыб *D. rerio*. Исследования проводили на самцах и самках *D. rerio* линии АВ, которых разделили на четыре смешанные по полу группы: контроль и на которых воздействовали в течение 10 дней 0.1, 0.2 и 0.5 мМ MnCl₂ (препарат добавляли в воду аквариума). В течение всего воздействия движения группы рыб непрерывно регистрировали и анализировали с помощью программы DanioStudio. На 11 день воздействия поведение рыб исследовали в тесте “новый аквариум”, затем в их головном мозге с помощью ВЭЖХ определяли уровни 5-НТ, 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), активности ключевых ферментов синтеза и разрушения 5-НТ, триптофангидроксилазы (ТПГ) и моноаминоксидазы (МАО), соответственно. Длительное воздействие MnCl₂ не повлияло на массу тела рыб, двигательную активность, время в нижней и верхней третях домашнего аквариума, а также на двигательную и исследовательскую активности, время в нижней и верхней третях в тесте “новый аквариум”. Длительное воздействие MnCl₂ не повлияло на уровни 5-НТ, 5-НИАА и активность МАО в мозге рыб. Однако активность ТПГ была резко увеличена у рыб, содержащихся при 0.2 и 0.5 мМ MnCl₂. В отдельном эксперименте было показано, что ионы Mn увеличивают термическую стабильность молекулы ТПГ *in vitro*. Эта стабилизирующая (шаперонная) активность ионов Mn была показана впервые. Открытие шаперонной активности ионов Mn позволит вскрыть фундаментальные молекулярные принципы и механизмы действия фармакологических шаперонов.

Ключевые слова: ионы марганца, серотонин, триптофангидроксилаза, моноаминоксидаза, мозг, поведение, *Danio rerio*

DOI: 10.31857/S1027813324030071, EDN: EQEFLP

ВВЕДЕНИЕ

Марганец (Mn) считается токсическим металлом и отходы его производства представляют значительную опасность для здоровья людей и экологии. Токсическое воздействие Mn характеризуется двигательными и сенсорными нарушениями, а также нейропсихиатрическими и когнитивными расстройствами [1–3]. Длительное воздействие Mn (>1 мг/м³) представляет собой фактор риска развития болезни Паркинсона у людей [4]. Ионы Mn могут проходить гемато-энцефалический барьер или через обонятельный тракт [5],

проникать внутрь нейронов через кальциевые каналы [6–9], индуцировать их апоптоз [10].

Одной из мишеней для ионов Mn может быть серотониновая (5-НТ) система мозга – совокупность нейронов синтезирующих 5-НТ в качестве основного медиатора. В норме 5-НТ система мозга участвует в регуляции большого числа физиологических функций и форм поведения [11, 12], тогда как нарушения ее функции наблюдаются при многих нейродегенеративных и психических заболеваниях [13–17].

Рыбы вида *Danio rerio* являются удобным модельным объектом для изучения общих закономерностей

влияния ионов Mn на 5-НТ систему мозга. Во-первых, 5-НТ система *D. rerio* имеет высокую анатомическую, цитологическую, биохимическую и фармакологическую гомологию с таковой млекопитающих [18, 19]. Во-вторых, у рыб этого вида 5-НТ контролирует двигательную активность и тревожность [20–23]. В-третьих, с помощью МРТ было показано накопление ионов Mn в мозге *D. rerio* при их содержании в растворе $MnCl_2$ [24]. Данные о влиянии ионов Mn на рыб *D. rerio* довольно противоречивы [25, 26]. Влияние ионов Mn на 5-НТ систему мозга рыб *D. rerio* не изучено.

Целью исследования является влияние хронического воздействия ионов Mn на метаболизм 5-НТ и регулируемое 5-НТ поведение рыб *D. rerio*. Для этого изучали влияния длительного содержания рыб в аквариумах с различными концентрациями $MnCl_2$ на их поведение в домашнем аквариуме, тесте “новый аквариум”, содержание 5-НТ, его основного метаболита, 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), активности ключевых ферментов синтеза (триптофангидроксилаз, ТПП) и окисления (моноаминоксидазы, MAO) 5-НТ в их мозге.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рыбы. Содержание рыб и все экспериментальные процедуры соответствовали положению Национального института здоровья (НИН) США от 12 апреля 2013 г. по использованию *D. rerio* в исследованиях и были одобрены комитетом по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 34 от 15.06.2016 г.). Разведение и содержание рыб поддержано бюджетным проектом FWNR-2022-0023.

Эксперименты проводили на взрослых (18 мес., $n = 100$) самцах и самках *D. rerio* линии АВ – потомков рыб, завезенных из European Research Institute of Biology of Ageing (ERIBA, Гронинген, Нидерланды). С возраста 6 недель и до начала экспериментов рыб содержали в аквариуме объемом 125 л, снабженном устройством биологической фильтрации и аэрации воды (CX-300, Chosen) с температурой воды $27 \pm 1^\circ C$ и искусственном освещении свет:темнота 12:12 ч (интенсивность освещения 1700 люкс, включение света производилось в 09:00 ч). Чистка и подмена воды (20%) производилась раз в неделю. Рыб кормили 6 раз в неделю сухим кормом Tetramin Tropical Flakes (Tetra) и один раз в неделю замороженными личинками *Chironomus plumosus*.

Были сформированы четыре смешанные по полу группы 20 рыб в каждой. Пять рыб из каждой экспериментальной группы помещали в аквариум ($20 \times 20 \times 20$ см, объем воды 6.3 л, 4 аквариума в каждой группе): контроль (без $MnCl_2$), 0.1, 0.2 и 0.5 мМ $MnCl_2$ в воде. Аквариумы были снабжены фильтрами. На протяжении всего эксперимента температура воды поддерживалась $27 \pm 1^\circ C$,

а световой режим свет:темнота 12:12 ч. Рыб кормили дважды в день сухим кормом Tetramin Tropical Flakes (Tetra). Подмену воды (30%) осуществляли раз в 3 дня. В данном эксперименте было показано, что концентрация ионов Mn в воде снижалась вдвое через 24 ч, поэтому концентрация $MnCl_2$ в воде аквариума корректировалась каждые 24 ч добавлением твердого $MnCl_2 \times 4H_2O$ (AppliChem, Дармштадт, Германия) до требуемой концентрации. Ранее с помощью МРТ было показано, что ионы Mn способны проникать из воды в мозг *D. rerio* и накапливаться там [24]. Непрерывное воздействие $MnCl_2$ продолжалось 10 дней, и в течение всего этого периода передвижения групп рыб в аквариумах регистрировалось и анализировалось программой DanioStudio [27]. На одиннадцатый день поведение рыб исследовали в тесте “новый аквариум”, усыпляли в холодной воде ($+2^\circ C$), выделяли целый мозг, замораживали его жидким азотом и хранили при $-80^\circ C$ до проведения нейрхимических измерений.

Измерение поведения группы рыб в домашнем аквариуме. Движения группы в домашнем аквариуме рыб фиксировались web-камерой и анализировались с помощью программного обеспечения DanioStudio [27]. Это программное обеспечение в течение 12-часового светового периода в течение 10 дней с частотой 1 с захватывает полутоновое изображение (640×480 пикселей) аквариума вместе с рыбами внутри и отделяет пиксели, связанные с рыбами, от пикселей, связанных с фоном, с помощью вычитания фона и порогового алгоритма. Постоянные элементы интерьера удаляли с помощью специальных масок. Для каждого кадра программа составляет карту пространственного положения и вычисляет сумму пикселей, связанных с рыбами. На основе этой карты определяются суммы связанных с рыбами пикселей в верхней и нижней трети резервуара. Отношения этих значений к общей сумме пикселей, связанных с рыбами, соответствуют времени (%), проведенному группой рыб в верхней и нижней трети. С помощью логической операции XOR для двух последовательных карт плотности определяется сумма пикселей, изменивших свое значение. Отношение этой величины к общей сумме пикселей соответствует двигательной активности группы рыб [27].

Измерение поведения рыбы в тесте “новый аквариум”. Рыбу осторожно вынимали из домашнего аквариума сачком (чтобы не стрессировать остальных) и помещали в стеклянную кювету длиной 24 см, глубиной 15 см и шириной 7 см, наполненную водой до 10 см. Кювету помещали в специальный шкаф. Движения рыбы фиксируются web-камерой в течение 5 минут и анализируются с помощью программного обеспечения EthoStudio [22, 23, 28]. Программное обеспечение с частотой 30 кадров/с автоматически покадрово

анализирует видеопоток в реальном времени, отделяет пиксели, связанные с рыбой, от пикселей фона с помощью порогового алгоритма, вычисляет координаты центра рыбы и автоматически рассчитывает карту плотности, соответствующую распределению пикселей, связанных с рыбой, в кювете. На основе последовательности координат и карты плотности: (1) расстояние, пройденное рыбой (м), (2) доля исследованного пространства кюветы (%), (3) среднее расстояние от дна кюветы (см) и время пребывания (%) в (4) нижней и (4) верхней третях кюветы [22, 23, 28]. Кювету промывают чистой водой после каждого испытания и наполняют смесью чистой воды и воды из домашнего резервуара в соотношении 1:1.

Определение концентрации ионов Mn в воде спектрофотометрическим методом. К 1 мл пробы воды или стандарта последовательно приливали 100 мкл смеси, содержащей 4% гидроксилламин и 0.8% формалин, 100 мкл раствора аммиака (1:3), перемешивали, инкубировали 5 мин и последовательно добавляли 100 мкл раствора трилона Б и 100 мкл 10% гидроксилламина. Перемешивали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 490 нм. Стандарты содержали 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 мкМ $MnCl_2$.

Определение уровня 5-НТ и 5-НИАА в мозге. Целый мозг рыбы гомогенизировали в 150 мкл холодного 50 мМ трис HCl, pH 7.6, с 1 мМ дитиотреитола. Аликвоту 50 мкл гомогената смешивали с 50 мкл 1.2 М $HClO_4$ для осаждения белка и экстракции 5-НТ и 5-НИАА. Остальной гомогенат (100 мкл) использовали для определения активности ТПГ и MAO.

Смесь гомогената и $HClO_4$ центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C). Супернатант, содержащий 5-НТ и 5-НИАА, разбавляли вдвое водой и концентрацию 5-НТ и 5-НИАА определяли с помощью ВЭЖХ на колонке Luna C18 (2) (размер частиц 5 мкм, L×ID 75×4.6 мм, Phenomenex, США) с электрохимическим детектированием (750 мВ, электрохимическим детектором DECADE II™, Antec, Нидерланды) и ячейкой из стеклографита (VT-03 3 мм GC sb, Antec, Нидерланды). Система ВЭЖХ включала контроллер CBM-20A, насос LC-20AD, автоматический дозатор SIL-20A и дегазатор DGU-20A5R (Shimadzu Corporation, США). Подвижная фаза содержала 13.06 г KH_2PO_4 , 200 мкл 0.5 М Na_2EDTA , 300 мг натриевой соли 1-октансульфоновой кислоты (Sigma, Германия), 940 мкл концентрированной H_3PO_4 и 130 мл метанола (13% объема, Vektor Ltd., Россия) в 1 л, pH = 3.2. Площади пиков были оценены с использованием программного обеспечения Lab Solution LG / GC версии 5.54 (Shimadzu Corporation, США) и откалиброваны с помощью стандартов, содержащих 0.5, 1 и 2 нг 5-НТ и 5-НИАА [23, 28].

Осадок после центрифугирования растворяли в 1 мл 0.1 М NaOH и количество белка в нем определяли по Бредфорду согласно инструкции производителя. Уровень 5-НТ и 5-НИАА выражали в нг/мг белка.

Определение активности ТПГ. Остаток гомогената мозга в 50 мМ трис HCl, pH 7.6 и 1 мМ дитиотреитола, центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C). Активность ТПГ определяли в чистом супернатанте. Осадок использовали для определения активности MAO.

Аликвоту 15 мкл супернатанта инкубировали 15 мин при 27°C в конечном объеме 25 мкл, содержащем 0.4 мМ L-триптофана, 0.3 мМ кофактора 6-метил-5,6,7,8-тетрагидробиоптеридина, 0.3 мМ ингибитора декарбоксилазы, м-гидроксибензилгидразина, 5 ед каталазы и 1 мМ дитиотреитола. Реакцию останавливали 75 мкл 0.6 М $HClO_4$ с последующим центрифугированием 15 мин при 12700 об/мин. Чистый супернатант разбавляли вдвое водой и количество синтезированного 5-гидрокситриптофана определяли с помощью ВЭЖХ как выше. Площади пиков 5-гидрокситриптофана калибровали по кривой, построенной по концентрациям 25, 50 и 100 пикомоль 5-гидрокситриптофана. Для определения белка аликвоту 10 мкл супернатанта смешивали с 90 мкл 0.1 М NaOH. Белок определяли по Бредфорду, следуя инструкциям производителя. Активность ТПГ выражали в пиколях 5-гидрокситриптофана синтезированного за мин в пересчете на мг белка [23, 28].

Определение активности MAO. Осадок после центрифугирования гомогената (см. выше) вновь гомогенизировали в 150 мкл 50 мМ Tris HCl, pH 7.6 и центрифугировали 15 мин (4°C) при 500 об/мин. Активность MAO определяли в мутном супернатанте. Аликвоту 10 мкл мутного супернатанта инкубировали 10 мин при 27°C с 0.1 мМ 5-НТ в конечном объеме 25 мкл. Реакцию останавливали добавлением 75 мкл 0.6 М $HClO_4$ с последующим центрифугированием 15 мин при 12700 об/мин. Чистый супернатант разбавляли вдвое водой и количество синтезированного 5-гидроксииндолуксусного альдегида определяли с помощью ВЭЖХ. Площади пиков 5-гидроксииндолуксусного альдегида калибровали по кривой, построенной по концентрациям 500, 1000 и 2000 пмоль 5-гидроксииндолуксусного альдегида [28].

Для определения белка аликвоту 10 мкл мутного супернатанта смешивали с 90 мкл 0.1 М NaOH. Белок определяли по Бредфорду, следуя инструкциям производителя. Активность MAO выражали в пиколях 5-гидроксииндолуксусного альдегида, синтезированного за мин, в пересчете на мг белка [28].

Определение влияния ионов Mn на термостабильность ТПГ головного мозга D. Rerio. Сначала аликвоты 10 мкл супернатанта, содержащего ТПГ,

смешивали с 5 мкл 50 мМ трис-НСl-буфером (рН 7.6), содержащего 1 мМ дитиотреитола, или с 0.15 мМ раствором $MnCl_2$ в этом буфере (конечная концентрация $MnCl_2$ составляла 0.05 мМ) и нагревали в течение 2 мин при 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64°C и затем быстро охлаждали во льду. Контрольные пробирки не нагревались. Затем добавляли 10 мкл смеси L-триптофана (1 мМ), 6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптеридина (0.75 мМ), ингибитора декарбоксилазы (0.75 мМ) и каталазы (5 ед.) и инкубировали при 27°C 15 мин. Реакцию останавливали, добавляя 75 мкл 0.6 мМ $HClO_4$. Пробы центрифугировали при 13000 об/мин, для хроматографа отбиралось по 80 мкл супернатанта с добавлением 80 мкл воды. Количество синтезированного 5-НТР определяли с помощью ВЭЖХ. Стандарты для расчётов: 25, 50, 100 пмоль. Были сформированы две группы по 6 термических кривых в каждой: (1) контрольная группа без $MnCl_2$, (2) группа с добавлением $MnCl_2$. Линейные части этих кривых использовались для расчета значений T_{50} с использованием метода линейной регрессии.

Статистика. Поскольку ранее было показано, что самцы и самки *D. rerio* не различаются по поведению, уровню 5-НТ, 5-Н1АА, активностям ТПГ и МАО [28], и количество самок в экспериментальных группах было значительно меньше, чем самцов, данные по самцам и самкам объединяли. Распределение всех показателей в экспериментальных группах соответствовало нормальному по критерию Колмогорова. Все данные представляли как средние \pm ошибка среднего и анализировали с помощью однофакторного ANOVA (Statistic 9.0, StatSoft, США). По необходимости различия между экспериментальными группами анализировали по Фишеру. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Не выявлено статистически значимых различий по активности ($F_{(3,12)} = 2.89, p = 0.079$), времени в верхней ($F_{(3,12)} = 2.93, p = 0.077$) и нижней ($F_{(3,12)} = 1.14, p = 0.37$) третях домашнего аквариума у рыб контрольной и подвергшихся действию различных концентраций $MnCl_2$ групп (рис. 1). У рыб, находящихся под воздействием различных концентраций $MnCl_2$, не выявляются ожидаемого снижения двигательной активности. Рыбы всех групп предпочитали находиться в верхней трети домашнего аквариума.

Содержание рыб в течение 10 дней при различных концентрациях $MnCl_2$ в воде не привело к межгрупповым различиям в массе их тела ($F_{(3,76)} < 1$, рис. 2).

В тесте “новый аквариум” не выявлено статистически значимых различий между группами рыб по пройденному пути ($F_{(3,76)} < 1$), доле исследованного пространства ($F_{(3,76)} = 1.08, p = 0.36$), времени нахождения в верхней ($F_{(3,76)} = 1.72, p = 0.17$) и нижней ($F_{(3,76)} = 2.64, p = 0.06$) третях аквариума (рис. 2). В то же время, межгрупповые различия были выявлены только по одному показателю – расстоянию центра рыбы от дна аквариума ($F_{(3,76)} = 2.73, p = 0.049$): у рыб, содержащихся при 0.5 мМ $MnCl_2$ этот показатель был достоверно выше, чем у контрольной группы ($p = 0.009$) (рис. 2).

Не выявлено статистически значимой разницы в уровнях 5-НТ ($F_{(3,36)} < 1$), 5-Н1АА ($F_{(3,36)} < 1$) и их соотношению (5-Н1АА/5-НТ, $F_{(3,36)} < 1$) мозге рыб, содержащихся 10 дней при концентрациях 0, 0.1, 0.2 и 0.5 мМ $MnCl_2$ в воде (рис. 3).

Не было также выявлено статистически значимой разницы между группами рыб по активности МАО в мозге ($F_{(3,36)} < 1$, рис. 4).

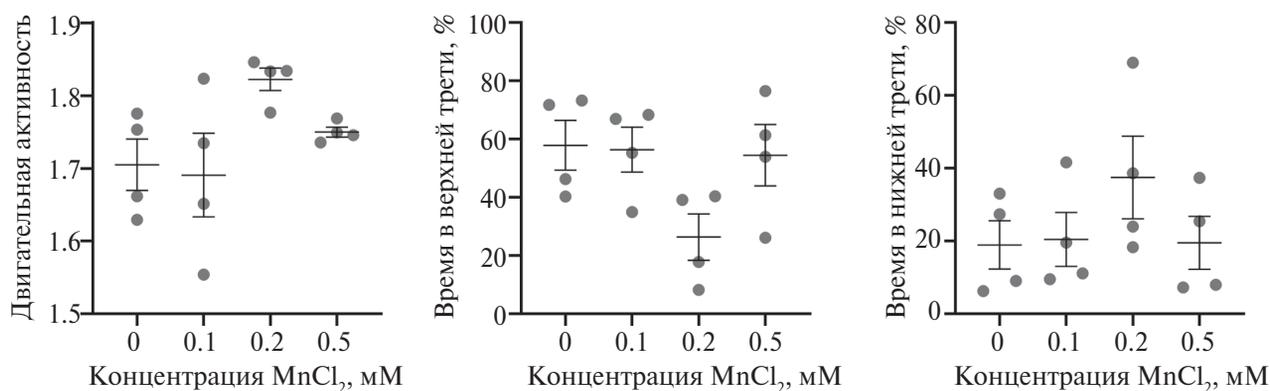


Рис. 1. Двигательная активность, время нахождения (%) в верхней и нижней третях домашнего аквариума у рыб, содержащихся в течение 10 дней в воде с 0 (контроль), 0.1, 0.2, 0.5 мМ $MnCl_2$. Точки представляют средние значения наблюдений 12 ч в день в течение 10 дней по каждому аквариуму. Черты представляют средние значения \pm ошибки средних по каждому аквариуму. Число аквариумов в каждой группе $n = 4$.

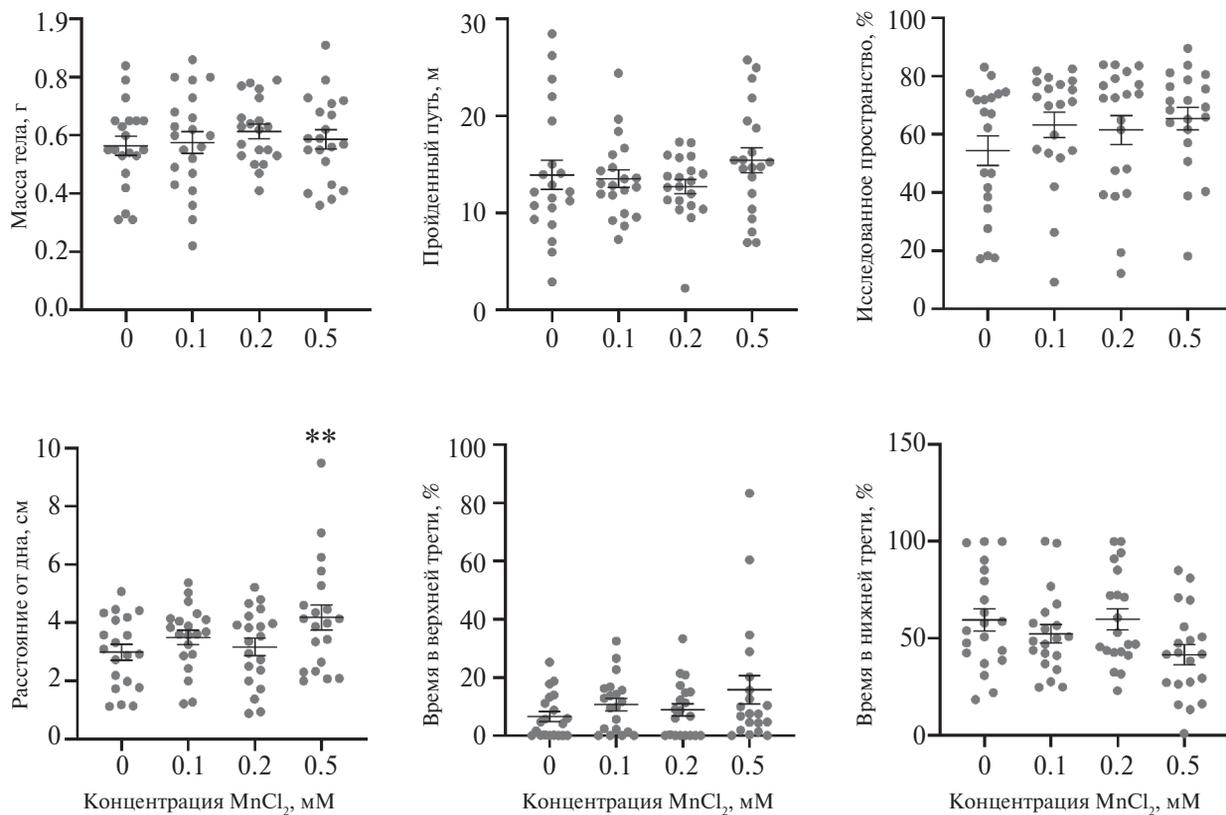


Рис. 2. Масса тела (г), пройденный путь (м), доля обследованного пространства (%), расстояние от дна (см), время нахождения (%) в верхней и нижней третях кюветы у рыб, содержащихся в течение 10 дней в воде с 0 (контроль), 0.1, 0.2, 0.5 мМ $MnCl_2$. Точки представляют индивидуальные значения показателей. Черты представляют средние значения \pm ошибки средних по каждому аквариуму. Каждая из 4 групп включала по 20 рыб.
** $p < 0.01$ vs контроль.

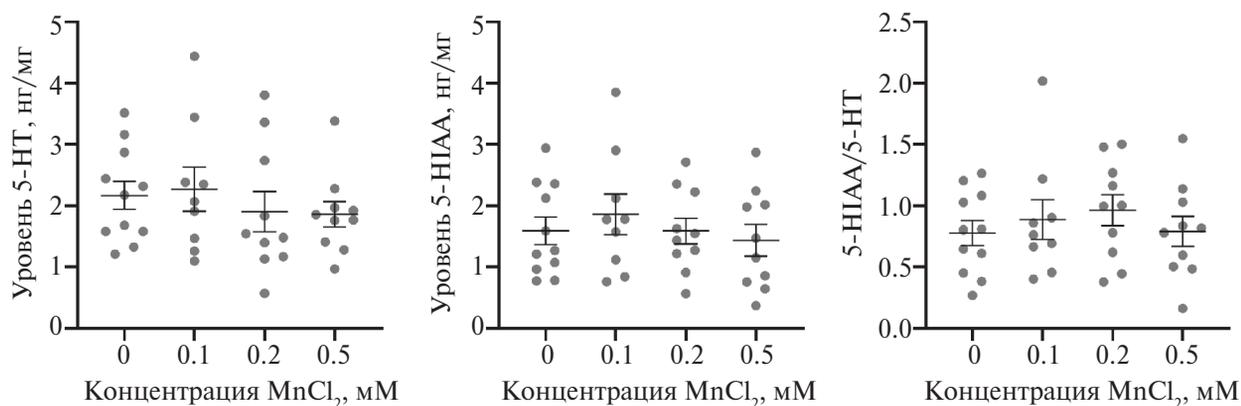


Рис. 3. Уровень 5-НТ (нг/мг), уровень 5-НИАА (нг/мг) и отношение 5-НИАА/5-НТ в мозге рыб, содержащихся в течение 10 дней в воде с 0 (контроль) ($n = 11$), 0.1 ($n = 9$), 0.2 ($n = 10$), 0.5 ($n = 10$) мМ $MnCl_2$. Точки представляют индивидуальные значения показателей. Черты представляют средние значения \pm ошибки средних по каждому аквариуму.

В то же время, группы рыб существенно различались по активности ТПГ в мозге ($F_{(3,35)} = 8.3$, $p < 0.001$, рис. 4). Было показано значительное увеличение активности фермента в мозге рыб, содержащихся при 0.2 ($p = 0.0005$) и 0.5 ($p = 0.02$) мМ $MnCl_2$ в воде (рис. 4).

Для проверки предположения, что ионы Mn повышают стабильность, время жизни и, как следствие — число активных молекул ТПГ и общую активность фермента, мы исследовали влияние 0.05 мМ $MnCl_2$ на температурную стабильность и величину T_{50} ТПГ *in vitro*. Было показано,

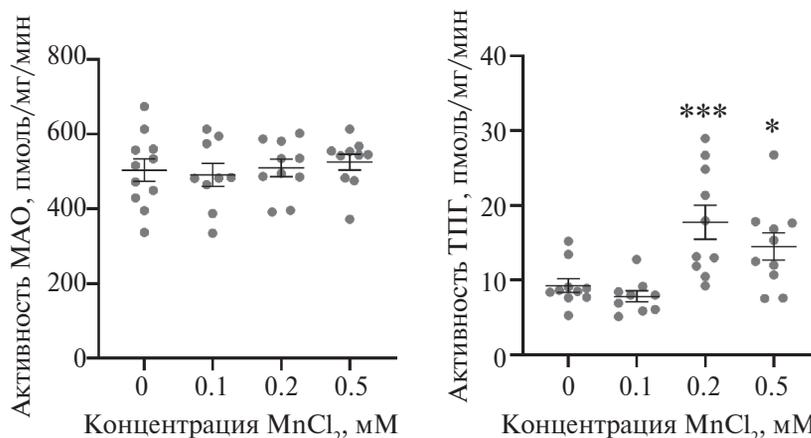


Рис. 4. Активности MAO (пмоль/мг/мин) и TPP (пмоль/мг/мин) в мозге рыб, содержащихся в течение 10 дней в воде с 0 (контроль) ($n = 11$), 0.1 ($n = 9$), 0.2 ($n = 10$), 0.5 ($n = 10$) мМ $MnCl_2$. Точки представляют индивидуальные значения показателей. Черты представляют средние значения \pm ошибки средних по каждому аквариуму. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs контроль.

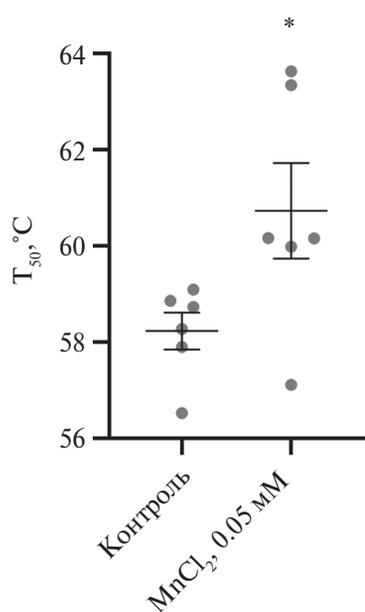


Рис. 5. Значения T_{50} для TPP из мозга *D. rerio* в отсутствии (контроль) и присутствии 0.05 мМ $MnCl_2$. Точки представляют индивидуальные значения T_{50} . Каждая группа включала 6 значений. Черты представляют средние значения \pm ошибки средних по каждому аквариуму. * $p < 0.05$ vs контроль.

что 0.05 мМ $MnCl_2$ увеличивало T_{50} TPP на 2.5°C (с 58.24°C до 60.74°C, $F_{(1,10)} = 5.53$, $p = 0.04$, рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью работы было изучение влияния длительного воздействия ионов Mn на 5-НТ систему головного мозга и контролируемые ею формы

поведения у рыб *D. rerio*. Исходя из наблюдений на людях предполагалось, что непрерывное длительное (10 дней) воздействие высоких концентраций $MnCl_2$ вызовет расстройства двигательной активности паркинсоно-подобного типа. Результаты оказались неожиданными: длительного воздействия относительно высоких концентраций оказалось недостаточно, чтобы вызвать снижение массы тела и нарушение двигательной активности. Возможно, для выявления негативного эффекта нужно взять более молодых рыб, увеличить концентрацию $MnCl_2$ и/или время воздействия. Следует отметить, что имеющиеся в литературе данные о влиянии ионов Mn на рыб *D. rerio* довольно противоречивы. Одни исследователи отмечали, что экспозиция рыб в течении 96 ч при концентрации Mn около 0.075 мМ снижала их двигательную активность [25]. Другие исследователи не обнаружили изменений в двигательной активности при содержании рыб в течении 96 ч при 0.08 мМ $MnCl_2$ [26]. Только при крайне высоких дозах (2 мМ) взрослые рыбы к 21-му дню воздействия показывают значимое сокращение пройденной дистанции [29]. Эти концентрации используют для моделирования марганизма на *D. rerio* и его лечения [30]. Представленные данные подтверждают общий тезис о высокой устойчивости рыб вида *D. rerio* к воздействию высоких доз $MnCl_2$, которая наблюдается также и у личинок *D. rerio* [31].

Более того, длительное содержание рыб в воде с высокой концентрацией ионов Mn (0.5 мМ) даже статистически значимо увеличило расстояние от дна в тесте “новый аквариум”, и наблюдалась тенденция к уменьшению времени нахождения в нижней трети кюветы ($p = 0.06$). Известно, что *D. rerio* в незнакомой и потенциально опасной обстановке стремятся находиться у дна. Это рассматривается

как защитная реакция [32, 33]. Некоторые авторы отмечают, что длительное воздействие ионов марганца усиливает выраженность данной защитной реакции у рыб [25, 26, 34]. Лишь в одном исследовании показано снижение выраженности защитной реакции у личинок *D. rerio* на 4 день их содержания в 1 мМ $MnCl_2$ [35].

Известно, что при марганизме ранняя фаза течения болезни характеризуется в большей степени психическими симптомами [36], поэтому, возможно, при более длительной экспозиции или большей концентрации могли бы проявиться локомоторные нарушения. По всей видимости, для взрослых *D. rerio* требуются крайне высокие концентрации (выше 1 мМ) для индукции похожих симптомов, наблюдающихся при марганизме, или воздействие на более ранних стадиях развития (выше 0.6 мМ), при которых воспроизводятся разнообразные нарушения движений (круговое плавание) и осанки, напоминающие таковые у людей [3].

С другой стороны, показано, что увеличение 5-НТ в синаптической щели при блокаде транспортера 5-НТ или MAO также снижает время нахождения в нижней трети [23]. Можно предположить, что длительное воздействие ионами Mn стимулирует метаболизм 5-НТ.

Однако не было обнаружено изменений в уровне 5-НТ и его метаболита, не изменилась активность фермента MAO. В то же время, активность ТПГ была повышена при длительном воздействии $MnCl_2$ в концентрациях 0.2 и 0.5 мМ. Несмотря на то, что увеличение активности ключевого фермента синтеза 5-НТ оказалось недостаточным, чтобы вызвать видимое увеличение уровня медиатора в мозге рыб, оно, по-видимому, способно объяснить наблюдаемое время у дна.

Было предположено, что ионы Mn способны стабилизировать молекулу ТПГ и тем самым увеличить срок ее жизни в организме. Для проверки этого предположения мы исследовали влияние ионов Mn на термическую стабильность ТПГ *in vitro*. Оказалось, что ионы Mn даже в небольшой концентрации (0.05 мМ) действительно повышают термическую стабильность ТПГ, что выражается в увеличении величины T_{50} – температуры, при которой денатурируется половина молекул. В среднем, молекулы ТПГ характеризуются периодом полужизни в 2–3 дня [37], Mn мог увеличить этот период, что привело к увеличению числа активных молекул ТПГ за период эксперимента и, в финале, к увеличению общей активности ТПГ в мозге.

Известно, что активность ТПГ зависит от ионов Fe, которые связываются с активным центром молекулы фермента и участвуют в переносе электронов [38]. Маловероятно, что ионы Mn способны замещать ионы Fe в активном центре, поскольку окислительно-восстановительные потенциалы

ионов железа и марганца резко различаются и такая замена могла бы снизить каталитическую активность фермента. Вероятнее всего стабилизирующая способность ионов Mn обусловлена их способностью взаимодействовать с некоторыми аминокислотными остатками (например, с остатками гистидина) молекулы ТПГ и укреплять ее 3D структуру, повышать ее устойчивость к температурным воздействиям. Такой стабилизирующий эффект называется шаперонным, а молекулы, стабилизирующие 3D структуру молекул белков – фармакологическими шаперонами [39–43]. В настоящее время показана способность тетрагидробиоптерина [44–47] повышать термическую стабильность ТПГ2 мыши *in vitro*. Выяснение молекулярного механизма взаимодействия фармакологических шаперонов с целевыми белковыми молекулами необходимо для лечения тяжелых наследственных заболеваний [43]. Поскольку взаимодействие ионов переходных металлов, в том числе ионов Mn, с молекулами белков может быть полностью смоделировано в ближайшем будущем, открытие шаперонной активности ионов Mn позволит вскрыть фундаментальные молекулярные принципы и механизмы действия фармакологических шаперонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первоначально целью данного исследования было моделирование на рыбах *D. rerio* молекулярных механизмов повреждающего воздействия ионов Mn на 5-НТ систему мозга и контролируемое 5-НТ поведение. Неожиданно, в ходе работы было выяснено, что 5-НТ система мозга и поведение рыб данного вида и данного возраста чрезвычайно устойчивы к ионам Mn. Длительное воздействие большими концентрациями ионов этого металла не повлияли на массу тела, поведение, уровень и метаболизм 5-НТ и активность MAO в мозге рыб. В то же время, впервые было показано, что длительное воздействие больших концентраций ионов Mn *in vivo* увеличивает активность ТПГ в мозге рыб *in vitro*. С помощью анализа кривых термической денатурации молекул ТПГ в присутствии и отсутствии ионов Mn *in vitro* впервые был выявлен молекулярный механизм этого явления, а именно стабилизация молекулы ТПГ ионами Mn.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 24-15-00078.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Этическое одобрение. Содержание рыб и все экспериментальные процедуры соответствовали положению Национального института здоровья (НИН) США от 12 апреля 2013 г. по использованию *D. rerio* в исследованиях и были одобрены комитетом по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 34 от 15.06.2016 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mattison D.R., Momoli F., Alyanak C., Aschner M., Baker M., Cashman N., Dydak U., Farhat N., Guilarte T.R., Karyakina N., Ramoju S., Shilnikova N., Taba P., Krewski D. // *Med. Int. (Lond)*. 2024. V. 4. P. 11.
- Pajarillo E., Nyarko-Danquah I., Adinew G., Rizor A., Aschner M., Lee E. // *Adv. Neurotoxicol.* 2021. V. 5. P. 215–238.
- Bakthavatsalam S., Das Sharma S., Sonawane M., Thirumalai V., Datta A. // *Dis. Model. Mech.* 2014. V. 7. P. 1239–1251.
- Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L., Kortsha G.X., Brown G.G., Richardson R.J. // *Neurotoxicology*. 1999. V. 20. P. 239–247.
- Dorman D.C., Brenneman K.A., McElveen A.M., Lynch S.E. // *J. Toxicol. Environm. Health*. 2002. V. 65. P. 1493–1511.
- Chen P., Chakraborty S., Mukhopadhyay S., Lee E., Paoliello M.M., Bowman A.B., Aschner M. // *J. Neurochem.* 2015. V. 134. P. 601–610.
- Osanai M., Hikishima K., Onoe H. // *Front. Neural. Circuits*. 2022. V. 16. P. 918500.
- Inoue T., Majid T., Pautler R.G. // *Rev. Neurosci.* 2011. V. 22. P. 675–694.
- Tanihira H., Fujiwara T., Kikuta S., Homma N., Osanai M. // *Front. Neural. Circuits*. 2021. V. 15. P. 787692.
- Dribben W.H., Eisenman L.N., Mennerick S. // *Cell Death Disease*. 2010. V. 1. P. 63.
- Lucki I. // *Biol. Psychiatry*. 1998. V. 44. P. 151–162.
- Popova N.K. // *Bioessays*. 2006. V. 28. P. 495–503.
- Blanchard D.C., Meyza K. // *Behav. Brain. Res.* 2019. V. 357–358. P. 9–17.
- Conio B., Martino M., Magioncalda P., Escelsior A., Inglese M., Amore M., Northoff G. // *Mol. Psychiatry*. 2020. V. 25. P. 82–93.
- Gosmann N.P., Costa M.A., Jaeger M.B., Motta L.S., Frozi J., Spanemberg L., Manfro G.G., Cuijpers P., Pine D.S., Salum G.A. // *PLoS Med.* 2021. V. 18. P. e1003664.
- Tiwari P., Fanibunda S.E., Kapri D., Vasaya S., Pati S., Vaidya V.A. // *FEBS J.* 2021. V. 288. P. 2602–2621.
- Miller B.R., Hen R. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2015. V. 30. P. 51–58.
- Panula P., Chen Y.C., Priyadarshini M., Kudo H., Semenova S., Sundvik M., Sallinen V. // *Neurobiology of disease*. 2010. V. 40. P. 46–57.
- Gaspar P., Lillesaar C. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012. V. 367. P. 2382–2394.
- Maximino C., Puty B., Benzecry R., Araújo J., Lima M.G., Batista E.D.J.O., Herculano A.M. // *Neuropharmacology*. 2013. V. 71. P. 83–97.
- Herculano A.M., Maximino C. // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2014. V. 55. P. 50–66.
- Kulikov A.V., Sinyakova N.A., Kulikova E.A., Khomenko T.M., Salakhutdinov N.F., Kulikov V.A., Volcho K.P. // *Lett. Drug. Des. Discov.* 2019. V. 16. P. 1321–1328.
- Evsukova V.S., Bazovkina D., Bazhenova E., Kulikova E.A., Kulikov A.V. // *Int. J. Mol. Sciences*. 2021. V. 22. P. 12851.
- Kulikov A.V., Sinyakova N., Kulikova E., Evglevsky N., Kolotygin I., Volcho K., Salakhutdinov N., Kulikov V., Romaschenko A., Moshkin M. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2019, V. 29. P. 198–199.
- Ferreira S.A., Loreto J.S., Dos Santos M.M., Barbosa N.V. // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2022. V. 93. P. 103870.
- Rodrigues G.Z.P., Staudt L.B.M., Moreira M.G., Dos Santos T.G., de Souza M.S., Lúcio C.J., Panizzon J., Kayser J.M., Simões L.A.R., Ziulkoski A.L., Bonan C.D. // *Chemosphere*. 2020. V. 244. P. 125550.
- Kulikov P.A., Sorokin I.E., Evsiukova V.S., Kulikov A.V. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2023. V. 175. P. 106–111.
- Evsukova V.S., Sorokin I.E., Kulikov P.A., Kulikov A.V. // *Behav. Brain Res.* 2024. V. 466. P. 115000.
- Nadig A.P.R., Huwaimel B., Alobaida A., Khafagy E.S., Alotaibi H.F., Moin A., Lila A.S.A., Suma M.S., Krishna K.L. // *Biomed. Pharmacother.* 2022. V. 155. P. 113697.
- Haridevamuthu B., Sudhakaran G., Pachaiappan R., Kathiravan M.K., Manikandan K., Almutairi M.H., Almutairi B.O., Arokiyaraj S., Arockiaraj J. // *Br. J. Pharmacol.* 2024.
- Hernández R.B., Nishita M.I., Espósito B.P., Scholz S., Michalke B. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2015. V. 32. P. 209–217.
- Kalueff A.V., Stewart A.M., Gerlai R. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2014. V. 35. P. 63–75.
- Stewart A.M., Braubach O., Spitsbergen J., Gerlai R., Kalueff A.V. // *Trends Neurosci.* 2014. V. 37. P. 264–278.
- Marins K., Lazzarotto L.M.V., Boschetti G., Bertonecello K.T., Sachett A., Schindler M.S.Z., Chitolina R., Regginato A., Zanatta A.P., Siebel A.M., Magro J.D., Zanatta L. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019. V. 26. N. 23. P. 23555–23570.

35. Altenhofen S., Wiprich M.T., Nery L.R., Leite C.E., Vianna M.R.M.R., Bonan C.D. // *Aquat. Toxicol.* 2017. V. 182. P. 172–183.
36. Bowman A.B., Kwakye G.F., Herrero Hernández E., Aschner M. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2011. V. 25. P. 191–203.
37. Meek J.L., Neff N.H. // *J. Neurochem.* 1972. V. 19. P. 1519–1525.
38. Fitzpatrick P.F. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2023. V. 735. P. 109518.
39. Gregersen N., Bross P., Vang S., Christensen J.H. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2006. V. 7. P. 103–124.
40. Muntau A.C., Leandro J., Staudigl M., Mayer F., Gersting S.W. // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2014. V. 37. P. 505–523.
41. Leandro P., Gomes C.M. // *Mini Rev. Med. Chem.* 2008. V. 8. P. 901–911.
42. Papp E., Csermely P. // In *Molecular Chaperones in Health and Disease. Handbook of Experimental Pharmacology* (Starke, K., Gaestel, M., eds). Springer. Berlin. Heidelberg. 2006. V. 172. P. 405–413.
43. Voronin M.V., Abramova E.V., Verbovaya E.R., Vakhitova Y.V., Seredenin S.B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 823.
44. Pey A.L., Ying M., Cremades N., Velazquez-Campoy A., Scherer T., Thöny B., Sancho J., Martinez A. // *J. Clin. Invest.* 2008. V. 118. P. 2858–2867.
45. Calvo A.C., Scherer T., Pey A.L., Ying M., Winge I., McKinney J., Haavik J., Thöny B., Martinez A. // *J. Neurochem.* 2010. V. 114. P. 853–863.
46. Waløen K., Kleppe R., Martinez A., Haavik J. // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2017. V. 21. P. 167–180.
47. Arefieva A.B., Komleva P.D., Naumenko V.S., Khotskin N.V., Kulikov A.V. // *Biomolecules.* 2023. V. 13. P. 1458.

Effects of Prolonged Exposure to Manganese Chloride on the Brain Serotonin Metabolism and Serotonin-Regulated Behavior in Zebrafish

A. E. Izyurov¹, I. E. Sorokin¹, V. S. Evsiukova¹, D. A. Zolotova¹, P. A. Kulikov¹, and A. V. Kulikov¹

¹*Institute of Cytology and Genetics SD RAS, Novosibirsk, Russia*

Manganese ions are toxic for the central nervous system and cause motor impairment. Zebrafish (*Danio rerio*) are widely used in neuroscience, psychopharmacology and toxicology. The study was aimed to investigate the effect of prolonged exposure to Mn ions on the serotonin (5-HT) system of the brain and the 5-HT controlled behavior in zebrafish. The studies were carried out on males and females of zebrafish line AB, which were divided into four groups: control and which were exposed to 0.1, 0.2 and 0.5 mM MnCl₂ for 10 days (the drug was added to the aquarium water). Throughout the exposure, the locomotion of fish were continuously recorded and analyzed using DanioStudio software. On the 11th day of exposure, the behavior of the fish was studied in the novel tank diving test, then the levels of 5-HT, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), the activity of key enzymes in the synthesis and destruction of 5-HT, tryptophan hydroxylase (TPH) and monoamine oxidase (MAO), respectively, were determined in their brain by HPLC. Prolonged exposure to MnCl₂ did not affect body mass, locomotor activity, time in the lower and upper thirds of the home aquarium, as well as locomotor and exploration activities, time in the lower and upper thirds in the novel tank diving test. Moreover, the prolonged exposure to MnCl₂ did not affect 5-HT, 5-HIAA levels and MAO activity in fish brain. However, TPH activity was significantly increased in fish kept at 0.2 and 0.5 mM MnCl₂. In an additional experiment, Mn ions were shown to increase the thermal stability of the TPH molecule *in vitro*. This stabilizing (chaperone) activity of Mn ions was demonstrated for the first time. The discovery of the chaperone activity of Mn ions will help to reveal the fundamental molecular principles and mechanisms of action of pharmacological chaperones.

Keywords: manganese ions, serotonin, tryptophan hydroxylase, monoamine oxidase, brain, behavior, zebrafish

**АНКСИОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛА
В СУБКОНВУЛЬСИВНОЙ ДОЗЕ СОПРОВОЖДАЕТСЯ
СНИЖЕНИЕМ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИИ
НЕЙРОНАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ЗАДНЕМ ГИППОКАМПЕ**

© 2024 г. В. А. Аниол¹ *, М. Ю. Степанчиков¹, А. А. Яковлев¹, Н. А. Лазарева¹,
Н. В. Гуляева¹

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*E-mail: aniviktor@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.07.2024 г.

После доработки 14.07.2024 г.

Принята к публикации 15.07.2024 г.

В предыдущих исследованиях нами было обнаружено подавление пролиферации клеток в герминативной области зубчатой извилины после однократного введения хемоконвульсанта пентилентетразола в субконвульсивной дозе. В настоящей работе мы показали, что это снижение пролиферации развивается на фоне острого анксиогенного эффекта пентилентетразола и характерно для задней части гиппокампа, где происходит также снижение числа клеток, экспрессирующих нейрональную NO-синтазу. Наблюдаемые изменения сопровождаются также снижением уровня белка nNOS в гиппокампе. В совокупности данные наблюдения могут указывать на возможное участие nNOS в подавлении пролиферации клеток зубчатой извилины заднего гиппокампа при развитии анксиогенного эффекта пентилентетразола.

Ключевые слова: нейрогенез, BrdU, пентилентетразол, nNOS, гиппокамп, зубчатая извилина, тревожность

DOI: 10.31857/S1027813324030081, EDN: EQAXWN

ВВЕДЕНИЕ

Постнатальный нейрогенез, то есть образование новых нейронов после рождения и в течение всей жизни, происходит в зубчатой извилине гиппокампа у большинства видов млекопитающих, включая человека [1], хотя активный нейрогенез у взрослых людей все еще остается в существенной степени предметом дискуссий [2–4]. Клетки-предшественники нейронов пролиферируют в зубчатой извилине на границе между гранулярным слоем и лежащим под ним полиморфным слоем (хилусом). Большинство новых клеток становятся гранулярными нейронами, и весь процесс созревания занимает у грызунов около 30 дней [5, 6]. Существующие гипотезы предполагают участие новых нейронов в выполнении ряда функций, зависящих от гиппокампа, таких как обучение, память и регуляция эмоций. С другой стороны, нарушения нейрогенеза в гиппокампе могут участвовать в патогенезе различных нейропсихических расстройств, таких как генерализованное

тревожное расстройство, депрессия и эпилепсия, и развитии коморбидности между ними [7, 8].

Ранее мы обнаружили снижение пролиферации клеток в нескольких герминативных зонах мозга (субвентрикулярной области боковых желудочков и субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа) на ранних этапах эпилептогенеза в модели пентилентетразолового киндлинга [9]. Известно, что снижение пролиферации новых клеток в гиппокампе может наблюдаться при стрессе и связанном с ним повышенном уровне глюкокортикоидов [10, 11]. Кроме того, существенную роль в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток играет система оксида азота [12].

В связи с этим мы предположили, что обнаруженное подавление пролиферации может быть связано с анксиогенным действием пентилентетразола (ПТЗ) в субконвульсивной дозе, которая была использована для выработки киндлинга, и сопровождаться локальными изменениями активности нитрергической системы. Проверка этого предположения была целью нашей настоящей работы.

МЕТОДЫ

Исследование тревожности после однократного введения ПТЗ. Для оценки тревожности в поведении животных после введения ПТЗ в субконвульсивной дозе использовали тест в приподнятом крестообразном лабиринте. В данном эксперименте было использовано 20 крыс-самцов линии Вистар массой 200–250 г в возрасте 3 мес. Животных содержали в условиях вивария при искусственном световом режиме (день 8:00 – 20:00) и свободном доступе к воде и пище по 5 животных в клетке. Перед экспериментом животных приучали к рукам в течение 4 дней. Десяти животным вводили ПТЗ внутривентриально в субконвульсивной дозе 37.5 мг/кг. ПТЗ растворяли в изотоническом (0.9%) растворе NaCl из расчета 1 мл/кг. Десяти крысам контрольной группы вводили чистый раствор NaCl в эквивалентном объеме. Через 5 мин после инъекции животных помещали в центр приподнятого крестообразного лабиринта, и в течение 5 минут записывали поведение животного при помощи видеокамеры. После окончания теста животных возвращали в домашнюю клетку. Между животными лабиринт очищали от загрязнений и обрабатывали 70° этиловым спиртом.

Маркирование пролиферации и подготовка ткани к исследованию. На следующий день после введения ПТЗ или NaCl и теста в крестообразном лабиринте части животных ($n = 4$ для каждой группы) производили мечение пролиферирующих клеток при помощи синтетического нуклеотида 5-бром-2'-дезоксидеоксиуридина (BrdU), который вводили внутривентриально 4 раза в дозе 50 мг/кг с интервалами по 2 часа. Спустя 30 минут после четвертой инъекции BrdU животных перфузировали раствором AFA (96%-ный этиловый спирт, 39%-ный формалин, ледяная уксусная кислота, в отношении 7:2:1), извлекали головной мозг и дофиксировали его в фиксаторе AFA. Мозг хранили в 70% этаноле до использования. Перед дегидратацией мозг переносили в 96% этанол на ночь. Дегидратацию и парафинирование образцов осуществляли в следующем порядке: изопропанол (2 раза по 30 мин) – смесь изопропанол:хлороформ (2:1, затем 1:1, затем 1:2, во всех случаях – до погружения образца на дно) – хлороформ (2 раза по 20 мин) – заливка в две смены жидкого парафина (в термостате при $t = 56–60^{\circ}\text{C}$, первый раз в течение ночи, второй раз в течение 2–3 часов) – окончательная заливка парафином. После затвердения парафиновых блоков готовили ленты серийных фронтальных срезов толщиной 10 мкм на всем протяжении мозга.

Иммуногистохимическое окрашивание. В работе исследовали включение BrdU в ядра и экспрессию нейрональной NO-синтазы (nNOS) в клетках мозга. В обоих случаях применяли непрямой иммунопероксидазный метод. Для

окрашивания в каждом случае отбирали серийные срезы мозга на всем его протяжении с интервалом 250 мкм между срезами и наклеивали их на стекла Superfrost/Plus (Fisher Scientific, USA). Затем полученные препараты депарафинировали и промывали в дистиллированной воде. Перед окрашиванием и в промежутках между различными стадиями срезы промывали в 0.01 М фосфатно-солевом буфере (PBS). Для подавления эндогенной пероксидазной активности на срезы наносили 3% раствор H_2O_2 в 0.01 М PBS на 10 мин. При окрашивании BrdU проводили дополнительное кислотное экспонирование антигенных участков ДНК в 2 М HCl при 37°C в течение 30 мин, после чего нейтрализовали кислый pH инкубацией в щелочном 0.1 М растворе $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ (pH = 9.5; 10 мин). При окрашивании nNOS этап кислотного экспонирования пропускали, переходя непосредственно к стадии блокировки. Блокировку проводили в течение 1 часа раствором, содержащим 5% козьей сыворотки (Gibco, USA) и 0.3% Тритона X-100 в 0.01 М PBS. Раствор такого же состава использовали в дальнейшем для растворения первичных и вторичных антител. С первичными антителами срезы инкубировали в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$ (моноклональные IgG мыши к BrdU BD Pharmingen, США, 1:2000 или поликлональные IgG кролика к nNOS, Chemicon, США, 1:4000). После этого на 2 часа наносили вторичные антитела – биотинилированные IgG козы к IgG мыши или биотинилированные IgG козы к IgG кролика (Sigma, USA) в разведении 1:800. Затем на связавшиеся биотинилированные антитела осаждали авидин-пероксидазный комплекс ABC Vectastain kit (Vector Laboratories, США), растворенный в 0.01 М PBS в соотношении 1:100 (1 час). Для проявки пероксидазной активности использовали хромогенный субстрат 3, 3'-диаминобензидин (DAB, SigmaFast kit, Sigma, США). Рабочий раствор DAB наносили на срезы и следили за развитием окраски под бинокулярной лупой. Через 3–5 мин реакцию останавливали промывкой в 0.01 М PBS. Затем срезы отмывали от остатков раствора DAB и заключали под покровное стекло с использованием раствора Permount (Fisher Scientific, США).

Количественный анализ результатов иммуногистохимического окрашивания. Подсчет BrdU-позитивных (BrdU+) клеток проводили в зубчатой извилине гиппокампа вручную на микроскопе Olympus CX-41 (Olympus Optical, Япония) при увеличении $\times 200$. В качестве позитивно окрашенных подсчитывали клетки, имеющие выраженное темно-коричневое окрашивание ядра или имеющие прозрачное ядро с сильноокрашенными глыбчатыми включениями в нем; в обоих случаях критерием учета было наличие видимой четкой границы ядра в плоскости среза. Качество окраски срезов предварительно проверяли по интенсивности

окрашивания ядер пролиферирующих клеток мягкой мозговой оболочки. В зубчатой извилине подсчет BrdU+ клеток осуществляли на всем протяжении ее герминативной зоны, т.е. в гранулярном и субгранулярном слое, определяемом как область толщиной в два тела нейрона (~ 20 мкм), прилежащую к гранулярному слою с его внутренней стороны [13]. Затем срезы фотографировали и определяли площадь герминативной зоны на каждом срезе, используя программу Image Pro (Media Cybernetics, Inc.). Итоговый результат выражали в виде числа BrdU+ клеток на мм². Объем исследованных герминативных зон достоверно не различался у животных разных групп.

Клетки, окрашенные на нейрональную изоформу NO-синтазы (nNOS+), обнаруживались во всех основных отделах мозга. Подсчет nNOS+ клеток выполняли как в гиппокампе, так и в коре больших полушарий. В гиппокампе анализировали зубчатую извилину (гранулярный слой), поле CA4, поле CA1 (пирамидный слой), а также радиальный слой в пределах полей CA1–CA3. В указанных отделах подсчитывали все nNOS+ клетки в границах, определяемых согласно атласу [14]. Число nNOS+ клеток в каждой исследуемой структуре соотносили с площадью, занимаемой данной структурой на микрофотографиях, и выражали в виде числа nNOS+ клеток на мм². В коре больших полушарий (неокортексе) nNOS+ клетки подсчитывали на каждом срезе в 5 случайно выбранных полях зрения площадью по 1 мм² каждое при увеличении ×100. Совокупно данные области подсчета охватывали практически всю площадь коры на срезе в пределах всех шести слоев коры. Результаты усредняли по всем полям зрения для каждого животного и выражали как число nNOS+ клеток на мм².

В связи с предполагаемой неоднородностью структур гиппокампа вдоль его передне-задней оси проводили отдельный анализ плотности клеток (BrdU+ и nNOS+) в передней и задней его частях. Условной границей между этими частями был выбран уровень 4.3 мм каудальнее брегмы. Установка границы на этом уровне была обусловлена тем, что данная фронтальная плоскость делит гиппокамп примерно поровну в передне-заднем направлении (от –2.3 до –4.3 и от –4.3 до –6.3 мм), а также с наличием удобного анатомического ориентира – появления вентральной порции зубчатой извилины на более каудальных срезах. В передней и задней частях гиппокампа число клеток так же приводили к площадям соответствующих структур.

Подготовка ткани к биохимическому исследованию. На следующий день после инъекции ПТЗ или NaCl часть животных, которым не вводили BrdU (n = 6 для каждой группы), декапитировали, извлекали головной мозг и на льду выделяли кору больших полушарий и гиппокамп, которые замораживали в жидком

азоте и до использования хранили при t = –80°C. Гомогенизацию структур проводили в тризол-буфере в соотношении 15:1 (мл:г). Белок выделяли для каждого животного из двух параллельных порций гомогената (по 0.5 мл). В дальнейшем параллельные пробы обрабатывали независимо, при анализе из двух параллельных результатов учитывали одно наиболее высокое значение.

Выделение белковой фракции из гомогенатов:

1) к 0.5 мл гомогената добавляли равный объем глицерина и смешивали, после чего добавляли 0.2 мл хлороформа, тщательно перемешивали в шейкере в течение 15 с, после чего оставляли на 15 мин до разделения фаз;

2) центрифугировали пробы при 12000 g и +4°C в течение 15 мин, после чего отбирали всю верхнюю фазу, добавляли к остаткам 0.15 мл этанола, перемешивали top-bottom и через 1 мин повторно центрифугировали при тех же условиях в течение 5 мин;

3) отбирали 300–400 мкл органической фазы, к которой добавляли ацетон в соотношении 1:3 и выдерживали в течение 2 мин, после чего в течение 5 мин центрифугировали при 1000 g и +4°C;

4) отбирали надосадочную жидкость, к осадку добавляли 500 мкл суспендирующего буфера (0.3 M гидрохлорида гуанидина и 2.5% глицерина в 96%-ном этаноле), затем тщательно перемешивали в шейкере в течение 5 мин и центрифугировали при 12000 g и 4°C в течение 5 мин;

5) отбирали надосадочную жидкость, к осадку добавляли растворяющий буфер (25 mM HEPES, 0.1 mM ЭДТА, 0.01 mM неокуприна, 2.5% SDS) и размешивали в шейкере в течение 1 часа.

После выделения белковой фракции проводили определение концентрации белка в каждой пробе по поглощению света при 280 и 260 нм при помощи спектрофотометра Ultrospec II (LKB Biochrom, UK), после чего разводили все образцы до концентрации белка 6 мг/мл.

Определение содержания белка nNOS в тканях коры и гиппокампа. Для оценки изменений количества белка nNOS в тканях коры и гиппокампа крыс после однократного введения ПТЗ использовали метод Western-blot. Все пробы нормировали по содержанию α-тубулина, определяемому тем же методом. Перед использованием в белковые пробы добавляли 5-кратный буфер в соотношении 4:1, после чего кипятили с целью денатурации структуры белка. Для гель-электрофореза готовили полиакриламидный гель (7.5% для nNOS и 12% для тубулина) толщиной 0.75 мм. Электрофорез проводили в течение 2 часов при силе тока 45 мА/пластину. После окончания электрофореза вырезали полосы геля, соответствующие массе целевых белков, и укладывали их в систему для переноски на

нитроцеллюлозную мембрану. Перенос осуществляли влажным способом в течение ночи при силе тока 90 мА/контейнер при +4°C. Нитроцеллюлозные мембраны промывали в TNT 3 раза по 5 мин, после чего блокировали в обезжиренном молоке, разведенном в TNT (10% для nNOS, 5% для тубулина), в течение 1 часа. Затем проводили инкубацию с первичными антителами (кроличьими поликлональными к nNOS, Chemicon Int., США, 1:4000 в 10% молоке, или мышинными моноклональными к α -тубулину, Sigma, США, 1:10000 в 2% молоке) в течение 2 часов. После этого мембраны промывали в TNT 4 раза по 5 мин, наносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой (для nNOS – IgG козы к IgG кролика, Bio-Rad, США; для α -тубулина – IgG козы к IgG мыши, Bio-Rad, США; в обоих случаях антитела разводили в обезжиренном 1% молоке в соотношении 1:1000) и инкубировали в течение 1 часа. После отмывки вторичных антител (4 раза по 5 мин в TNT) мембраны инкубировали в течение 3 минут с люминол-перекисной смесью ECL Plus (Amersham, США) и регистрировали свечение на пленке X-Ray RetinA XBM Blue sensitive, после чего проявляли и фиксировали фотоизображение. Цифровую обработку фотоизображений проводили с помощью программы Total Lab.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft, США). Поскольку распределение сравниваемых параметров носило неправильный характер, а число значений в каждой группе было небольшим, группы сравнивали между

собой методом Mann-Whitney. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm S.E.M.$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поведение животных после однократного введения ПТЗ в субконвульсивной дозе. Введение ПТЗ в дозе 37.5 мг/кг не вызывало существенных внешних проявлений судорожной активности, за исключением кратковременных периодов замирания или лицевых автоматизмов, тремора вибрисс, что оценивалось не выше 1 балла по шкале Racine [15]. В приподнятом крестообразном лабиринте, куда животных помещали спустя 5 минут после введения ПТЗ или раствора NaCl, крысы обеих групп большую часть времени теста проводили в закрытых рукавах. Время, проведенное в открытом рукаве, имело тенденцию ($p < 0.1$) к снижению после введения ПТЗ (таблица 1, рис. 1). Число посещений открытого рукава у животных, получивших ПТЗ, было достоверно ниже, чем у животных контрольной группы (таблица 1, рис. 1а). Тем не менее, число посещений закрытого рукава также отличалось в меньшую сторону у животных после введения ПТЗ, что дало основание заподозрить снижение двигательной активности. Действительно, подсчет длины пройденного пути по числу пересеченных квадратов в лабиринте показал достоверное снижение этого показателя у крыс после введения ПТЗ (рис. 1б). Для того, чтобы оценить тревожность животных с учетом различной двигательной активности, отдельно подсчитывали число

Таблица 1. Поведение животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. Жирным шрифтом отмечены различия, которые считали достоверными при принятом уровне значимости $p < 0.05$ (тест Манна-Уитни)

		контроль		ПТЗ (37,5)		p (M-W test)
		среднее	\pm S.E.M.	среднее	\pm S.E.M.	
Входов в:	открытый рукав	0.9	0.4	0.1	0.1	0.0435
	закрытый рукав	2.5	0.4	1.0	0.0	0.0017
	центр	2.4	0.6	0.1	0.1	0.0036
Время в (с):	открытом рукаве	10.5	6.1	3.6	3.6	0.0858
	закрытом рукаве	274.7	7.7	286.3	4.2	0.2451
	центре	14.8	3.0	10.1	1.7	0.2429
Число стоек		17.2	1.6	0.6	0.4	0.0003
Число свешиваний		3.1	0.9	0.1	0.1	0.0015
Число пересеченных секторов		29.8	4.6	9.6	2.7	0.0021
Двигательная активность в светлом рукаве, %		9.5	3.0	4.2	4.2	0.0290

пересеченных секторов в светлой (открытый рукав и центр) и темной (закрытый рукав) частях лабиринта. У животных контрольной группы по сравнению с животными, получившими ПТЗ, достоверно большая доля двигательной активности приходилась на открытую часть лабиринта ($p < 0.05$; M-W test, таблица 1, рис. 1а). Кроме того, действие ПТЗ проявлялось также в подавлении исследовательской активности (снижение числа стоек с 17.2 ± 1.6 до 0.6 ± 0.4 , $p < 0.001$, M-W test; числа свешиваний с 3.1 ± 0.9 до 0.1 ± 0.1 , $p < 0.005$, M-W test; таблица 1, рис. 1д – е).

Таким образом, можно заключить, что введение ПТЗ в дозе 37.5 мг/кг не сопровождалось развитием видимых моторных судорог, но приводило к угнетению моторной и исследовательской активности, а также к повышению уровня тревожности крыс.

Пролиферация клеток в герминативной зоне гиппокампа. В передней части зубчатой извилины (ростральнее уровня брегма -4.3 мм) после введения ПТЗ плотность пролиферирующих клеток достоверно не изменялась ($p > 0.1$, M-W test). В задней же, каудальной части, где у контрольных

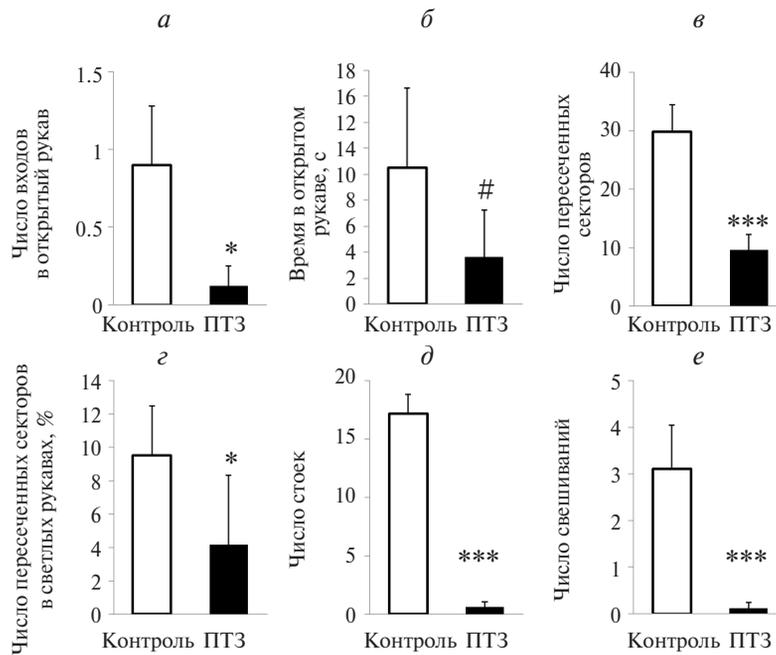


Рис. 1. Поведение животных в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. Число входов (а) и время в открытом рукаве (б), общее число пересеченных секторов (в) и их доля в светлом рукаве (г), число стоек (д) и свешиваний (е). Данные приведены в виде $M \pm SEM$. # – $p < 0.1$, * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.005$, тест Манна-Уитни, отличие от контрольной группы.

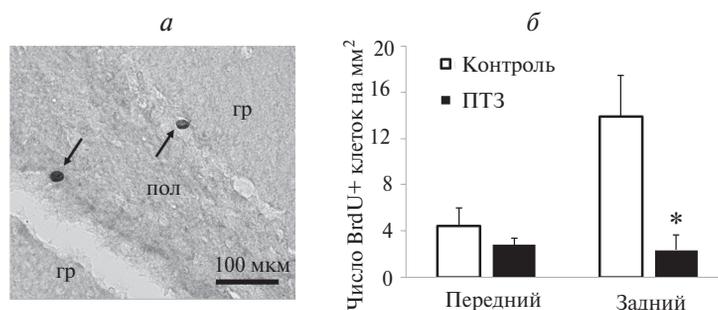


Рис. 2. Пролиферация клеток в герминативной зоне зубчатой извилины после введения ПТЗ в субконвульсивной дозе. а – стрелками отмечено иммуногистохимическое окрашивание включения BrdU в ядра клеток на границе гранулярного (гр) и полиморфного (пол) слоев зубчатой извилины (увеличение $\times 400$, шкала 100 мкм). б – число BrdU+ клеток в зубчатой извилине переднего и заднего гиппокампа. Данные приведены в виде $M \pm SEM$. * – отличие от контрольной группы, $p < 0.05$, тест Манна-Уитни.

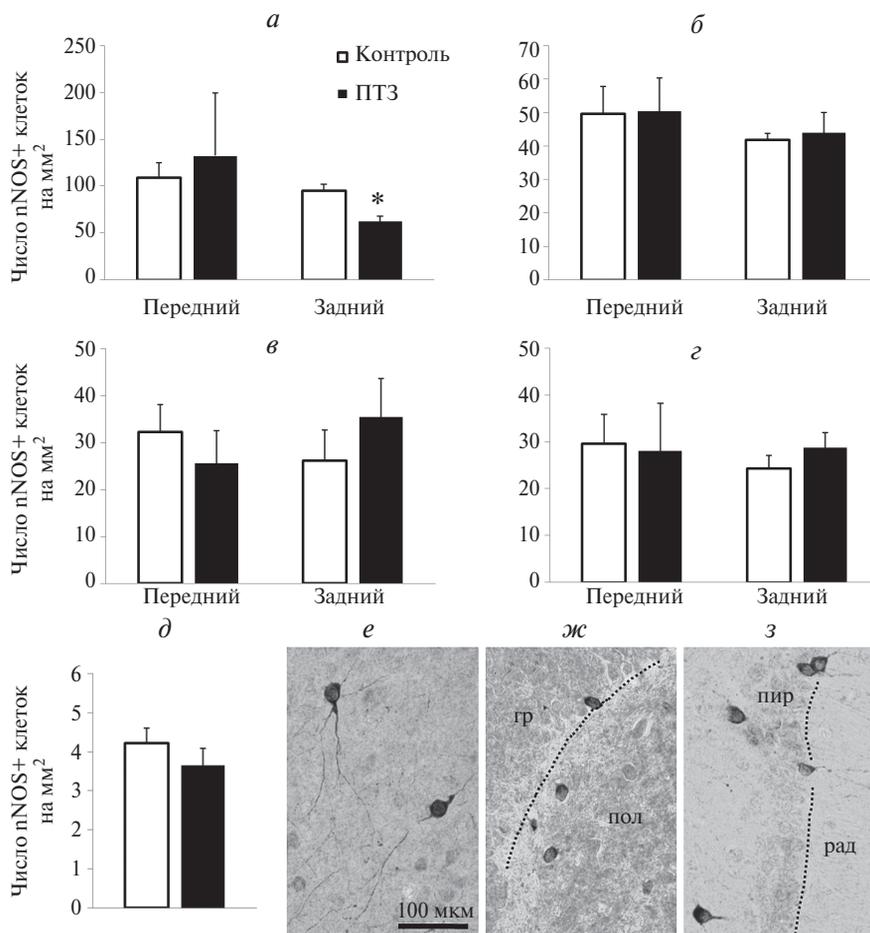


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание pNOS в клетках мозга после введения ПТЗ в субконвульсивной дозе. *a – г*, число pNOS+ клеток в различных отделах гиппокампа (*a* – в пирамидном слое поля CA1, *б* – в зубчатой извилине, *в* – в радиальном слое полей CA1-CA3). Данные приведены в виде $M \pm SEM$ отдельно для передней и задней частей гиппокампа. * – отличие от контрольной группы, $p < 0.05$, тест Манна-Уитни. *д* – число pNOS+ клеток в неокортексе, различий между группами нет. *e – з*, примеры иммуногистохимического окрашивания pNOS в различных отделах мозга (*e* – неокортекс, *ж* – зубчатая извилина, *з* – после CA1, увеличение $\times 400$, шкала 100 мкм для всех изображений). Пунктирной линией указаны границы между гранулярным (гр) и полиморфным (пол) слоями зубчатой извилины (*ж*) и пирамидным (пир) и радиальным (рад) слоями поля CA1 (*з*).

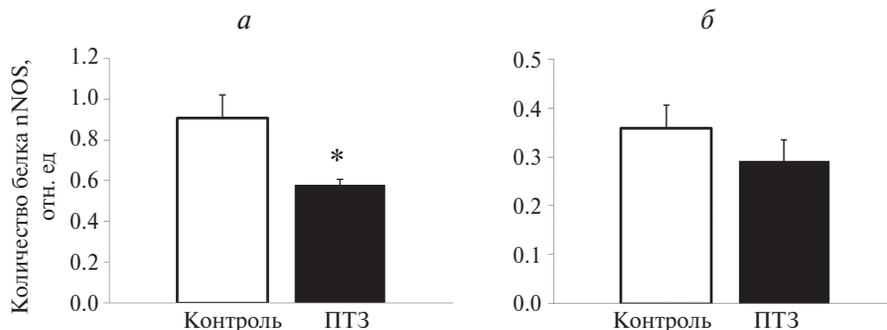


Рис. 4. Определение белка pNOS методом вестерн-блот в мозге после введения ПТЗ в субконвульсивной дозе. *a* – гиппокамп, *б* – неокортекс. Результаты представлены как отношение оптических плотностей полос pNOS и α -тубулина и выражены в относительных единицах. Данные приведены в виде $M \pm SEM$. * – отличие от контрольной группы, $p < 0.05$, тест Манна-Уитни.

животных плотность расположения BrdU+ клеток была заметно выше, после введения ПТЗ наблюдалось достоверное снижение интенсивности пролиферации ($p < 0.05$; M-W test; рис. 2б).

Изменения в нитрергической системе. Число nNOS+ клеток в переднем гиппокампе значимо не менялось, тогда как в заднем гиппокампе отмечалось достоверное снижение числа nNOS+ клеток в пирамидном слое поля CA1 (рис. 3а). Уровень белка nNOS в тканях гиппокампа также достоверно снижался после введения ПТЗ (рис. 4а).

В неокортексе число nNOS+ клеток значимо не менялось, чему соответствовало отсутствие изменений в содержании белка nNOS в тканях коры, определяемом по методу вестерн-блот (рис. 3б; рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Пентилентетразол (ПТЗ) является блокатром протоксинавого сайта ГАМК_A-рецептора [16], нарушающим вход ионов Cl⁻ в нейрон и приводящим к ослаблению торможения и развитию деполяризации [17]. Кроме того, ПТЗ вызывает снижение плотности ГАМК_A-рецепторов в мозге, а также усиление глутаматергической передачи [18–20]. Следствием этого является повышение возбудимости нейронов, снижение судорожного порога и развитие судорожной активности. Эти свойства определяют ценность ПТЗ в качестве препарата в различных схемах моделирования судорог. В малых дозах ПТЗ может обладать также анксиогенными свойствами [21–24], связанными с тем же механизмом блокады ГАМК_A-рецептора. В нашем исследовании для оценки тревожности мы использовали тест в приподнятом крестообразном лабиринте [25]. Введение ПТЗ в субконвульсивной дозе приводило к угнетению моторной и исследовательской активности, а также уменьшало число выходов в светлый рукав и двигательную активность в светлом рукаве. Последний показатель подсчитывали для того, чтобы внести поправку на общее уменьшение двигательной активности после введения ПТЗ. Таким образом, поведение животных в крестообразном лабиринте свидетельствовало в пользу анксиогенного эффекта использованной нами дозы ПТЗ (37.5 мг/кг). Известно, что глюкокортикоидные гормоны, выделяющиеся во время стресса, способны подавлять клеточную пролиферацию в герминативных зонах мозга [26]. По-видимому, наблюдавшееся снижение пролиферации клеток в зубчатой извилине частично связано с повышением уровня тревожности у подопытных животных после введения субконвульсивной дозы ПТЗ.

Ранее нами было показано снижение пролиферации клеток в герминативных зонах мозга (субвентрикулярной области боковых желудочков и субгранулярном слое зубчатой извилины

гиппокампа) после однократного введения ПТЗ в субконвульсивной дозе в ходе развития пентилентетразолового киндлинга [9]. Результаты данного исследования предполагают, что обнаруженное подавление пролиферации более характерно для задних (каудальных или вентральных) отделов гиппокампа крыс, но не для передней его части. Известно, что задний гиппокамп, благодаря своим тесным анатомическим связям с миндалевидным комплексом, задействуется в формировании эмоциональных реакций [27, 28]. В этой связи можно предположить наличие связи между наблюдающимися реакциями тревожного поведения и селективным снижением пролиферации клеток в нейрогенной нише задней части зубчатой извилины.

Ранее было показано, что и однократные, и хронические судороги, вызванные введением ПТЗ (в частности, киндлинг), сопровождаются увеличением экспрессии nNOS в зубчатой извилине и увеличением продукции NO [29–32]. При этом увеличение экспрессии nNOS в гиппокампе на фоне острой судорожной активности сопровождалось также увеличением числа пролиферирующих клеток, а ингибирование nNOS приводило к относительному ослаблению вызванной судорогами клеточной пролиферации [29]. В нашей работе, напротив, снижение пролиферации клеток после введения ПТЗ в субконвульсивной дозе, не приводящей к развитию моторных судорог, сопровождалось снижением уровня белка nNOS и числа nNOS+ клеток в гиппокампе, причем и снижение пролиферации, и снижение числа nNOS+ клеток происходило в заднем отделе гиппокампа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе показано, что обнаруженное ранее снижение пролиферации клеток в зубчатой извилине гиппокампа после однократного введения ПТЗ в субконвульсивной дозе развивается на фоне острого анксиогенного эффекта ПТЗ и характерно лишь для задней части гиппокампа. Там же, в задней части гиппокампа, введение ПТЗ приводит к снижению числа nNOS+ клеток в поле CA1. В гиппокампе в целом также снижается уровень белка nNOS, тогда как в неокортексе ни уровень белка, ни число nNOS+ клеток достоверно не меняются. В совокупности данные наблюдения могут указывать на возможное участие nNOS в локальном подавлении пролиферации клеток зубчатой извилины заднего гиппокампа при развитии анксиогенного эффекта ПТЗ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема “Нейрофизиологические

и биохимические механизмы патологии нервной системы, нейродегенерация”, регистрационный номер: 1021062411628-8-3.1.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. // *Nat. Med.* 1998. V. 4. № 11. P. 1313–1317.
- Boldrini M., Fulmore C.A., Tartt A.N., Simeon L.R., Pavlova I., Poposka V, Rosoklija G.B., Stankov A., Arango V, Dwork A.J., Hen R., Mann J.J. // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 22. № 4. P. 589–599.e5.
- Kempermann G., Gage F.H., Aigner L., Song H., Curtis M.A., Thuret S., Kuhn H.G., Jessberger S., Frankland P.W., Cameron H.A., Gould E., Hen R., Abrous D.N., Toni N., Schinder A.F., Zhao X., Lucassen P.J., Frisén J. // *Cell Stem Cell.* 2018. pii: S1934-5909(18)30166-8.
- Sorrells S.F., Paredes M.F., Cebrian-Silla A., Sandoval K., Qi D., Kelley K.W., James D., Mayer S., Chang J., Augustine K.I., Chang E.F., Gutierrez A.J., Kriegstein A.R., Mathern G.W., Oldham M.C., Huang E.J., Garcia-Verdugo J.M., Yang Z., Alvarez-Buylla A. // *Nature.* 2018. V. 555. № 7696. P. 377–381.
- Cameron H.A., Woolley C.S., McEwen B.S., Gould E. // *Neuroscience.* 1993. V. 56. № 2. P. 337–344.
- Gage F.H. // *Science.* 2000. V. 287. № 5457. P. 1433–1438.
- Scharfman H.E., McCloskey D.P. // *Epilepsy Res.* 2009. V. 85. № 2–3. P. 150–161.
- Yun S., Reynolds R.P., Masiulis I., Eisch A.J. // *Nat. Med.* 2016. V. 22. № 11. P. 1239–1247.
- Aniol V.A., Stepanichev M.Y., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V. // *Epilepsy Behav.* 2011. V. 22. № 3. P. 433–441.
- Gould E., McEwen B.S., Tanapat P., Galea L.A., Fuchs E. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 7. P. 2492–2498.
- Brummelte S., Galea L.A. // *Neuroscience.* 2010. V. 168. № 3. P. 680–690.
- Aniol V.A., Stepanichev M.Y. // *Neurochem. J.* 2007. V. 1. P. 265–274.
- Gray W.P., Sundstrom L.E. // *Brain Res.* 1998. V. 790. P. 52–59.
- Paxinos G., Watson Ch. // *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press, Inc., 1998.
- Racine R.J. // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1972. V. 32. P. 281–294.
- Ito M., Chiu T.H., Rosenberg H.C. // *Neurochem. Res.* 1986. V. 11. № 5. P. 637–646.
- Olsen R.W. // *Mol. Cell. Biochem.* 1981. V. 39. P. 261–279.
- Bazyan A.S., Zhulin V.V., Karpova M.N., Klishina N.Y., Glebov R.N. // *Brain Res.* 2001. V. 888. № 2. P. 212–220.
- Corda M., Orlandi M., Lecca D., Giorgi O. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992. V. 262. P. 792–798.
- Ekonomou A., Smith A.L., Angelatou F. // *Mol. Brain Res.* 2001. V. 95. P. 27–35.
- Rodin E.A., Calhoun H.D. // *J. Nerv. Ment. Dis.* 1970. V. 150. № 6. P. 438–443.
- Rodin E.A., Rutledge L.T., Calhoun H.D. // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1958. V. 10. № 4. P. 719–723.
- Benjamin D., Lal H., Meyerson L.R. // *Life Sci.* 1990. V. 47. № 3. P. 195–203.
- Giusti P., Guidetti G., Costa E., Guidotti A. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991. V. 257. № 3. P. 1062–1068.
- Rodgers R.J., Cole J.C., Aboualfa K., Stephenson L.H. // *Pharm. Biochem. Behav.* 1995. V. 52. № 4. P. 805–813.
- Gould E., Gross C.G. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 3. P. 619–623.
- Snyder J.S., Radik R., Wojtowicz J.M., Cameron H.A. // *Hippocampus.* 2009. V. 19. № 4. P. 360–370.
- Snyder J.S., Ramchand P., Rabbett S., Radik R., Wojtowicz J.M., Cameron H.A. // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. № 6. P. 1149–1156.
- Jiang W., Xiao L., Wang J.C., Huang Y.G., Zhang X. // *Neurosci. Lett.* 2004. V. 367. P. 344–348.
- Bashkatova V., Vitskova G., Narkevich V., Vanin A., Mikoyan V., Rayevsky K. // *J. Mol. Neurosci.* 2000. V. 14. P. 183–190.
- Kaneko K., Itoh K., Berliner L.J., Miyasaka K., Fujii H. // *Magn. Reson. Med.* 2002. V. 48. P. 1051–1056.
- Яковлев А.А., Перегуд Д.И., Павлова Т.В., Гulyaeva Н.В. // *Нейрохимия.* 2004. Т. 21. № 1. С. 58–67.

Anxiogenic Effect of Pentylentetrazole in a Subconvulsive Dose is Accompanied by Decreased Cellular Proliferation and Neuronal NO-Synthase Expression in the Posterior Portion of the Hippocampus

V. A. Aniol¹, M. Yu. Stepanichev¹, A. A. Yakovlev¹, N. A. Lazareva¹, and N. V. Gulyaeva¹

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia

In our previous studies, we have found a suppressive effect of a single administration of pentylentetrazole (PTZ) in a subconvulsive dose on cellular proliferation in the dentate gyrus. In the present work, we show that this decrease in proliferation develops after acute anxiogenic effect of PTZ and is present only in the posterior portion of the hippocampus, where a decrease in the number of neuronal NO synthase expressing cells has been also found. These changes are also accompanied by a decrease in the level of nNOS protein in the hippocampus. Taken together, these observations may indicate the possible involvement of nNOS in the suppression of cellular proliferation in the dentate gyrus of the posterior hippocampus during the development of the anxiogenic effect of PTZ.

Key words: adult neurogenesis, BrdU, pentylentetrazole, nNOS, hippocampus, dentate gyrus, anxiety

УДК 612.822

ПРОСТОЙ МЕТОД ОЦЕНКИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АСТРОЦИТОВ: ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛОВОГО ДИМОРФИЗМА ДИНАМИКИ СОЗРЕВАНИЯ АСТРОЦИТОВ В МИНДАЛИНЕ КРЫС

© 2024 г. А. О. Манолова¹, *, Н. А. Лазарева¹, А. Э. Парамонова¹, А. А. Квичанский¹, М. С. Одринская¹, М. Ю. Степаничев¹, Н. В. Гуляева¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*E-mail: anna.manolova@ihna.ru

Поступила в редакцию 25.03.2024 г.

После доработки 07.04.2024 г.

Принята к публикации 08.04.2024 г.

При проведении доклинических исследований важно иметь доступные, простые и надежные методы оценки состояния ткани мозга, с помощью которых можно оценить эффективность того или иного препарата или воздействия. Морфология астроцитов достаточно хорошо отражает функциональное состояние синапсов, поэтому может быть использована как косвенный показатель состояния нейрональных сетей. В статье описан метод оценки морфологических характеристик астроцитов с использованием эпифлуоресцентной микроскопии и программы ImageJ. Приведен пример применения этого метода для исследования динамики изменения морфологических характеристик астроцитов базолатерального ядра миндалины в ходе нормального онтогенеза. Предложенный метод позволяет оценить не только плотность популяции клеток, но и их морфологические показатели, соответствующие степени ветвления и длине отростков астроцитов. В результате применения метода был обнаружен половой диморфизм в динамике созревания астроцитов в базолатеральном ядре миндалины, выражающийся в увеличении длины отростков в ходе взросления от ювенильного до подросткового возраста у самок, но не у самцов.

Ключевые слова: астроглия, цифровая обработка изображений, базолатеральное ядро миндалины, половой диморфизм, онтогенез

DOI: 10.31857/S1027813324030092, EDN: EPZFTX

ВВЕДЕНИЕ

Миндалина является важной частью лимбической системы мозга. Ее функционирование вовлечено в обеспечение таких эмоциональных реакций, как страх и тревога, и необходимо для адекватного их проявления на поведенческом уровне, в том числе для социальных взаимодействий. Нарушения в работе миндалины обнаруживают при таких психоневрологических заболеваниях, как расстройства тревожно-депрессивного спектра, разного рода зависимости, шизофрения, аутизм. Исследования, проведенные с использованием магнитно-резонансной томографии (МРТ), показывают, что созревание структур лимбической системы мозга и их реципрокных проекций происходит в возрасте пубертата [1, 2]. Эти проекции существуют с раннего возраста, но в период с подросткового до взрослого возраста происходит их значительное изменение, характеризующееся уменьшением числа волокон

и увеличением силы синапсов [3, 4]. При этом сроки созревания структур мозга больше соответствуют пубертатному статусу со слов испытуемых, чем их биологическому возрасту, и ассоциированы с уровнем тестостерона [5]. Почти во всех исследованиях отмечают половой диморфизм в созревании структур лимбической системы [6]. В миндалине довольно большая концентрация рецепторов стероидных гормонов [7], и обнаружен как функциональный, так и морфологический половой диморфизм [8–10]. Существует представление о том, что зависящие от пола различия в функционировании миндалины могут лежать в основе диспропорции подверженности психоневрологическим заболеваниям мужчин и женщин.

На сегодняшний день не оставляет сомнений тот факт, что астроциты необходимы для нормального функционирования и жизнедеятельности нейронов. Более того, они необходимы и для

правильного созревания нейрональных сетей [11]. По морфологическим характеристикам астроцитов, таким, например, как степень разветвленности, можно судить о степени функциональной нагрузки на отдел мозга [12, 13]. Существует мнение, что астроциты миндалины являются очень чувствительными и пластичными клетками, развивающимися и отвечающими на внешние стимулы в очень специфичной манере, свойственной только этой субпопуляции [14]. Учитывая тот факт, что астроциты экспрессируют рецепторы эстрогена, можно предположить их участие в осуществлении различий созревания и функционирования миндалины в зависимости от пола индивидуума. Влияние половых гормонов на морфологические характеристики астроцитов обнаружено в аркуатном ядре [15], в гиппокампе [16] и в медиальном ядре миндалины [17].

Таким образом, по состоянию астроцитов можно косвенно судить о состоянии нейрональных сетей миндалины, а значит, исследование морфологических характеристик астроцитов может дать представление о степени отклика на экспериментальное воздействие в животных моделях психоневрологических заболеваний и об эффективности использования того или иного препарата в доклинических исследованиях. Учитывая, что иммуногистохимия и эпифлуоресцентная микроскопия являются довольно широко распространенными в лабораторной практике, метод оценки состояния астроцитов с их помощью может быть широко применен в различных лабораториях. Целью работы было описание такого простого и доступного метода, позволяющего получить данные о морфологических характеристиках астроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы фронтальные 50-микронные срезы мозга крыс, окрашенные иммунофлуоресцентно антителами к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) – маркеру фиброзных астроцитов. Биоматериал был получен от 27 животных следующих групп: самцы ПД18 ($n = 5$), самки ПД18 ($n = 5$), самцы ПД30 ($n = 8$), самки ПД30 ($n = 9$) (ПД – постнатальный день). Микрофотографии получали из области базолатерального ядра миндалины (координаты для возраста ПД18 -2.20...-2.80 mm Bregma по атласу мозга крыс Хазипова [18]; координаты для возраста ПД30 -3.14...-3.60 mm Bregma по атласу мозга Паксона и Уотсона [19]). Для получения микрофотографий использовали микроскоп Axio.Imager.Z2 (Zeiss, Германия), оснащенный цифровой фотокамерой MRm (Zeiss, Германия), с использованием объектива x40 (EC Plan-NEOFLUAR, NA = 0.75). Экспозиция выбиралась для каждого среза с тем, чтобы максимально

прослеживались отростки клеток, но при этом она не должна была превышать 2 мс, так как экспозиция дольше 2 мс значительно увеличивает фоновый шум. С помощью программного модуля ZEN blue edition (2011) (Zeiss, Германия) получали z-стеки, т.е. набор микрофотографий с последовательных фокальных плоскостей, отстоящих друг от друга на расстояние 1 мкм, так, чтобы была покрыта вся толщина среза мозга. При наших параметрах фотографирования такой z-стек является цифровым отображением части базолатерального ядра миндалины размером $224 \times 168 \times 50$ мкм и вмещает в себя около 10–15 GFAP-позитивных клеток с отростками. От каждого животного получали по 2 z-стека с разных срезов мозга, расстояние между которыми составляло не менее 300 мкм в rostro-каудальном направлении.

Предварительную обработку полученных микрофотографий проводили в программе Fiji (ImageJ, NIH, ver. 1.53c) с использованием авторских скриптов и макросов. На первом этапе из полученных z-стеков делали проекции максимальной интенсивности, что позволяет работать дальше с изображениями как с обычными двумерными, но при этом сохраняет все детали морфологических особенностей объектов. При этом изображения сразу переводили в формат 8-битных (функция “8-bit”) и производили уменьшение фонового шума с использованием функции “Despeckle”. Далее из полученных изображений вырезали изображения отдельных клеток. Над каждым изображением отдельной клетки производили следующие действия: 1) увеличение контраста с нормализацией гистограммы изображения (функция “Enhance Contrast...”); 2) размытие контуров (функция “Gaussian Blur...”, $\epsilon = 1$); 3) бинаризация путем применения фильтра, использующего локальный порог интенсивности (фильтр Niblack с радиусом 5, функция “Auto Local Threshold”); 4) фильтрация полученных объектов по размеру с удалением всех объектов меньше 100 пикселей (функция “Analyze Particles...”). После этого при необходимости производили ручную доработку полученных объектов такую, как присоединение некоторых отростков к основному объекту и стирание объектов больше 100 пикселей, не относящихся к целевому объекту. Всю ручную доработку производили, сверяясь с изначальным, не бинаризованным, изображением клетки. Полученный массив бинаризованных изображений преобразовывали в скелетонизированные изображения функцией “Skeletonize”. Такие изображения представляют собой тонкие линии, толщиной 1 пиксель, точно повторяющие все отростки клетки. На рис. 1 представлены этапы преобразования микрофотографии астроцита. С математической точки зрения такое изображение является графом, поэтому к нему применимы методы работы с графами.

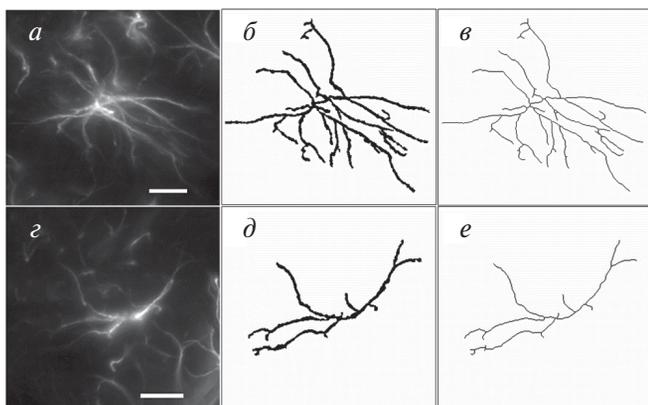


Рис. 1. Этапы обработки изображения астроцита от микрофотографии до графа-скелетона на примере более (*a–в*) и менее (*г–е*) разветвленных клеток. *a, г* – микрофотография астроцита, *б, д* – бинаризованное изображение, *в, е* – скелетонизированное изображение. Шкала – 10 мкм.

Функция “Analyze Skeleton (2D/3D)” позволяет получить следующие характеристики для каждого графа-скелетона: число ребер графа, число точек ветвления (вершин графа, из которых выходит не менее трех ребер), число конечных точек (число вершин графа, из которых выходит только одно ребро), среднюю длину ребра, максимальную длину ребра и максимальный кратчайший путь (самое длинное расстояние от одной конечной точки до другой). На выходе мы получаем таблицу, в которой для каждой клетки указаны все характеристики соответствующего ей скелетона. С каждого изображения вырезали по 2–3 клетки, таким образом, было проанализировано от 4 до 6 клеток на животное.

Плотность популяции астроцитов оценивали на полученных на первом этапе обработки

микрофотографий проекциях максимальной интенсивности. Подсчитывали число клеток, имеющих не менее двух разветвленных отростков и не пересекающих запрещенные границы (левую и нижнюю границы изображения).

Статистическую обработку проводили в программе R-Studio (ver. 2022.02.0). Полученные характеристики для каждой клетки усредняли на животное, проверяли соответствие нормальному распределению (тест Шапиро-Уилка), проводили корреляционный анализ с целью выявления коллинеарности между различными характеристиками (тест Пирсона), затем проводили двухфакторный дисперсионный анализ с факторами “пол” и “возраст”, предварительно убедившись в равенстве дисперсий разных групп (тест Левена), в качестве *post hoc* анализа использовали тест Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Плотность популяции астроцитов в базолатеральном ядре миндалины в ходе взросления от ювенильного (ПД18) до подросткового (ПД30) возраста увеличивалась независимо от пола. Так, число астроцитов у самцов в ПД18 составила 5492 ± 4753 шт/мм³, у самок в ПД18 2498 ± 951 шт/мм³, у самцов в ПД30 – 8208 ± 3506 шт/мм³, у самок в ПД30 – 6643 ± 3891 шт/мм³. По данным двухфакторного дисперсионного анализа влияние фактора “возраст” было статистически достоверно значимым: $F(1, 26) = 5.46, p = 0.027$ (рис. 2).

При анализе автоматически полученных показателей графов-скелетонов важно понимать с какими физиологическими обусловленными морфологическими характеристиками астроцитов их можно соотнести. Так, например, число ребер графа, как и число точек ветвления, косвенно говорит о степени разветвленности отростков астроцита. Поскольку длина ребра является по сути расстоянием

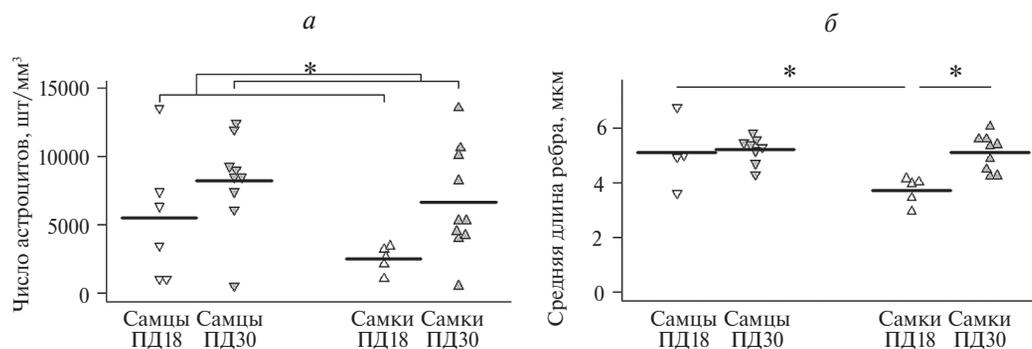


Рис. 2. Результаты статистической обработки полученных морфологических характеристик. *a* – увеличение плотности популяции астроцитов в базолатеральном ядре миндалины с возрастом: $F(1, 26) = 5.46, p = 0.027$, нет эффекта пола. *б* – увеличение средней длины ребра графа-скелетона обнаружено у самок, но не у самцов: “пол”*“возраст” – $(F(1, 22) = 4.52, p = 0.045)$, самцы ПД18 vs самки ПД18 – $p = 0.040$, самки ПД18 vs самки ПД30 – $(p = 0.011)$ (Тьюки *post hoc*). Среднее значение по группе отмечено горизонтальной полосой.

между точками ветвления, то по этому показателю можно косвенно судить о длине отростков астроцита. Максимальный кратчайший путь соответствует суммарной длине двух наиболее длинных отростков клетки. По результатам корреляционного анализа измеренные показатели можно разделить на две группы, внутри которых показатели статистически достоверно коррелируют. К первой группе относятся показатели, описывающие степень разветвленности астроцита, а ко второй – показатели, так или иначе соотносящиеся с длиной отростков астроцита. В таблице 1 указаны средние значения и ошибка среднего для всех перечисленных параметров.

Поскольку использование большого числа параметров для описания морфологии клетки нецелесообразно, необходимо выбрать несколько из них. По результатам корреляционного анализа оказалось, что достаточными для анализа параметрами являются число ребер графа и средняя длина ребра графа. Действительно, эти два параметра не коррелируют между собой и соотносятся с разными характеристиками морфологии астроцита. По числу ребер графа-скелетона, соответствующего астроциту, можно судить о степени ветвления отростков: чем больше ребер у графа, тем больше точек ветвления. Средняя длина ребра не соответствует напрямую длине отростков, но поскольку отростки складываются из отрезков от ветвления до ветвления, то косвенным образом эта величина будет говорить о длине отростков астроцита. Для каждого из этих параметров был проведен двухфакторный дисперсионный анализ. Целью анализа было выявление влияния факторов “пол” и “возраст” на морфологию астроцитов в миндалине. Среднее число ребер графа-скелетона составило у самцов ПД18 33 ± 21 , у самок ПД18 21 ± 12 , у самцов ПД30 35 ± 7 , у самок ПД30 36 ± 13 .

Дисперсионный анализ не выявил статистической значимости ни эффекта фактора “возраст”, ни эффекта фактора “пол” на число ребер графа. По всей видимости, с возраста ПД18 по возраст ПД30 не наблюдается значительного увеличения ветвления отростков у астроцитов базолатерального ядра миндалины ни у самцов, ни у самок крыс.

Среднее расстояние от точки ветвления до точки ветвления составило: у самцов ПД18 5.1 ± 1.3 мкм, у самок ПД18 3.7 ± 0.5 мкм, у самцов ПД30 5.2 ± 0.5 мкм, у самок ПД30 5.1 ± 0.7 мкм. Дисперсионный анализ показал статистически значимый эффект фактора “возраст” ($F(1, 22) = 7.93$, $p = 0.010$) и взаимодействия факторов “пол” и “возраст” ($F(1, 22) = 4.52$, $p = 0.045$). Эффект фактора “пол” был выражен только на уровне тенденции: $F(1, 22) = 3.93$, $p = 0.060$. Апостериорный анализ (тест Тьюки) выявил достоверное различие между группами самцы ПД18 и самки ПД18 ($p = 0.040$), и между группами самки ПД18 и самки ПД30 ($p = 0.011$). Таким образом, в базолатеральном ядре миндалины наблюдается увеличение примерно на 20% средней длины отрезка отростка астроцита между двумя соседними ветвлениями у самок крыс при взрослении от ювенильного до подросткового возраста. У самцов аналогичного увеличения длины отростков в этом возрастном периоде не выявлено. Стоит отметить, что у самцов в ювенильном возрасте эта величина уже составляет около 5 мкм, а у самок как раз до этого размера доходит к подростковому возрасту. Для таких характеристик, как максимальная длина ребра и максимальное кратчайшее расстояние, также были обнаружены статистически достоверные эффекты фактора “возраст” ($F(1, 23) = 15.17$, $p = 0.0007$ и $F(1, 23) = 4.31$, $p = 0.049$, соответственно) и взаимодействия факторов на уровне тенденции. Учитывая наличие корреляции между

Таблица 1. Усредненные значения параметров графов-скелетонов астроцитов для каждой из исследованных групп. Приведены средние и ошибка среднего. \$ – $p < 0.07$ по сравнению с группой другого пола того же возраста, * – $p < 0.05$ по сравнению с группой животных ПД18 того же пола.

	Морфологические характеристики	Самцы ПД18	Самцы ПД30	Самки ПД18	Самки ПД30
Параметры, характеризующие разветвленность астроцита	Число ребер графа	33 ± 11	35 ± 2	21 ± 5	36 ± 4
	Число точек ветвления	16 ± 5	17 ± 1	10 ± 3	17 ± 2
	Число конечных точек	18 ± 5	19 ± 1	12 ± 3	19 ± 2
Параметры, характеризующие длину отростков астроцита	Средняя длина ребра, мкм	5.1 ± 0.6	5.2 ± 0.2	3.7 ± 0.2 \$	5.0 ± 0.2 *
	Максимальная длина ребра, мкм	18 ± 2	21 ± 1	13 ± 2	21 ± 1 *
	Максимальное кратчайшее расстояние, мкм	60 ± 8	59 ± 2	40 ± 8	58 ± 3 *

этимися тремя характеристиками, которые, по сути, по-разному описывают такую физиологическую характеристику, как длина отростка астроцита, схожесть результатов статистической обработки очевидна.

Таким образом, в ходе нормального онтогенеза при взрослении крыс с ПД18 до ПД30 популяция астроцитов в базолатеральном ядре миндалины увеличивается у самцов примерно в 1.5 раза, а у самок в 2.5 раза. При этом степень разветвленности астроцитов не изменяется ни у самцов, ни у самок, и только у самок увеличивается длина отростков между двумя соседними ветвлениями. По всей видимости, астроциты базолатерального ядра миндалины самок претерпевают более значительные изменения при взрослении животных от ювенильного до подросткового возраста, чем у самцов. Использование автоматически полученных морфологических характеристик клеток позволило выявить как наличие полового диморфизма в созревании астроцитов, так и уточнить специфику этого различия.

При поставленном и отработанном методе оценки морфологических особенностей астроцитов на обработку данных по базолатеральному ядру миндалины потребовалось примерно следующее количество человеко-часов (оценка для эксперимента, в котором участвовало около 25 животных): иммуногистохимическое окрашивание – 2 дня, микрофотографирование – около 10 часов, обработка микрофотографий (включающая этапы ручной обработки, такие как вырезание отдельных клеток и правку полученных бинаризованных изображений) – 12–15 часов (около 3 часов на настройку скриптов и подбор фильтров для бинаризации, 1–2 часа на вырезание отдельных клеток, 7–10 часов на правку полученных бинаризованных изображений), 1–2 часа – время для стандартной статистической обработки. Последний этап ручной обработки (правка автоматически полученных бинаризованных изображений) является одним из самых трудоемких и времязатратных. Облегчить и ускорить этот этап можно улучшением качества иммуногистохимического окрашивания (увеличение соотношения сигнал/шум, уменьшение фонового окрашивания) и подбором наиболее оптимальных фильтров бинаризации. Суммарно получается, что результаты эксперимента можно получить за две недели рабочего времени.

ОБСУЖДЕНИЕ

Половой диморфизм в экспрессии наиболее часто используемого маркера астроцитов – GFAP – известен довольно давно. Повышенный его уровень у самцов по сравнению с самками связывают с более высоким уровнем тестостерона в крови. В структурах, относящихся к проявлению полового

поведения, показаны различия в экспрессии уже в первые дни жизни [15]. В лимбических структурах, в том числе в миндалине, указывают на зависимость иммунореактивности GFAP от уровня половых гормонов [17, 20, 21]. При этом основную роль отводят не самому тестостерону, а его метаболиту – эстрогену. Распространенность фермента, превращающего тестостерон в эстроген, в различных структурах мозга также зависит от пола животного, и в лимбических структурах, в том числе в миндалине, его экспрессия выше у самцов [22]. Механизм индукции тестостероном (или эстрогеном) повышенной экспрессии GFAP до сих пор неизвестен. В недавнем довольно обширном обзоре по регуляции экспрессии гена GFAP нет упоминания стероидных гормонов [23], но ранее была показана возможность астроцитарного ответа на активацию рецепторов эстрогена без вовлечения геномного аппарата (through nongenomic activity) [24]. Учитывая, что состояние, а значит и внешний облик астроцитов отражают функциональное состояние синапсов [13, 25], различие между самцами и самками в морфологии астроцитов миндалины может говорить о половом диморфизме функционирования нейрональных сетей этой структуры, что, как предполагается, может лежать в основе различий в подверженности психоневрологическим заболеваниям у мужчин и женщин. Поэтому исследование морфологических характеристик астроцитов в лимбических структурах может помочь в понимании механизмов психоневрологических патологий. В особенности важен для исследования подростковый период, так как именно в это время образуются реципрокные связи миндалины с гиппокампом и другими структурами [1, 2, 5, 6].

Несмотря на то, что визуализация с использованием иммуногистохимического окрашивания на GFAP позволяет проявить только около 15% самой клетки [26, 27], метод оценки состояния астроцитарной глии по морфологическим характеристикам GFAP-позитивных клеток считается достаточно валидным [28, 29]. Однако если оценка проводится только по иммунореактивности ткани (процент иммуногистохимически окрашенной площади ко всей площади исследуемой структуры), то сложно сделать вывод о причине обнаруженных различий. Изменения иммунореактивности ткани могут быть проявлением как увеличения плотности популяции астроцитов, так и увеличения числа их отростков, их утолщения или усиления ветвления. Так, в нашем исследовании оказалось, что половой диморфизм в созревании астроцитов в базолатеральном ядре миндалины проявляется в различии длины отростков GFAP-позитивных клеток. По нашим данным можно предположить, что у самцов отростки астроцитов достигают длины, близкой к таковой у зрелых астроцитов, раньше, чем у самок. Мы можем судить об этом по тому, что

максимальное кратчайшее расстояние у самцов уже в ПД18 составляет около (60 ± 8) мкм и не изменяется к подростковому возрасту (ПД30: (59 ± 2) мкм). При этом считается, что диаметр площади, занимаемой астроцитом во взрослом мозге у грызунов составляет примерно 40–60 мкм (в зависимости от структуры мозга) [30, 31], что достаточно точно совпадает с полученной нами оценкой (суммарной длины двух наиболее длинных отростков). У самок же обнаружено статистически достоверное увеличение средней длины отрезка между ветвлениями, что говорит об увеличении длины отростков астроцитов в период с ПД18 до ПД30. При этом увеличение плотности популяции GFAP-позитивных клеток происходило как у самцов, так и у самок крыс. У самок число GFAP-позитивных клеток увеличилось значительно, но это не было статистически значимо. Другие исследования также указывают на большее число новых GFAP-позитивных клеток в миндалине у самок, чем у самцов в подростковом возрасте. Так, группа MM MacCarthy показала, что в препубертатном возрасте (ПД14) у самок в миндалине больше GFAP-позитивных клеток, чем у самцов [32]. В другом исследовании было показано, что число вновь появившихся клеток (включивших метку BrdU) в возрасте ПД30 в миндалине было больше у самцов, однако процент таких клеток локализованных с GFAP был примерно в полтора раза больше у самок [33]. Таким образом, полученные нами данные по динамике плотности популяции астроцитов при взрослении с ювенильного до пубертатного возраста, в целом, совпадают с данными литературы. В дополнение к этому мы впервые показали наличие полового диморфизма в динамике морфологических показателей астроглии базолатерального ядра миндалины в этот возрастной период.

Не смотря на широкое распространение методов цифровой обработки изображений, большинство исследователей ограничиваются оценкой иммунореактивности ткани или подсчетом числа клеток. Возможно, это вызвано тем, что исследование морфологических особенностей представляется времязатратным и трудоемким процессом. Действительно, в работах, в которых приводится оценка морфологических параметров астроцитов, как правило используют микрофотографии на большом увеличении с использованием масляных объективов и построение 3D-изображений при помощи рутинного ручного “трэйсинга” отростков с помощью дорогостоящих коммерческих программ (например, Neuro Lucida (MBF Bioscience, США)). Так, в работе [34] исследовали реакцию астроцитов миндалины взрослых крыс на повышение уровня тестостерона в крови. Полученные авторами данные по средней длине ребра, числу точек ветвления и числу конечных точек совпадают с данными, полученными нами (учитывая, что они использовали

другую линию крыс и взрослых животных). При этом их метод выглядит значительно более трудоемким, так как они производили микрофотографирование с использованием масляного объектива $\times 100$ и ручной трэйсинг отростков астроцитов. В другой работе [28] микрофотографирование осуществляли с использованием конфокального микроскопа и восстанавливали 3D-изображение астроцитов с помощью плагина Neurite Tracer (Fiji, NIH, США). Сравнение полученных ими данных с нашими несколько затруднено, так как работа выполнена на взрослых самцах мышей и использован метод Шолля для оценки морфологических характеристик астроцитов. Тем не менее, один из параметров является аналогом максимального кратчайшего расстояния, полученного в нашей работе, и результаты приблизительно совпадают: 35–50 мкм – в работе Bondi et al [28], 40–60 мкм – в нашей работе. При этом по сравнению с двумя вышеупомянутыми работами описанный в статье метод проще по выполнению и требует меньших затрат времени. Как указано в разделе результаты, на обработку эксперимента, в котором участвует около 25 животных, потребуется не более двух недель от стадии готовых срезов мозга до стадии получения результатов статистического анализа. Стоит также отметить, что данный метод не требует использования компьютера значительной производительности, а также особых навыков оператора.

Предложенный в статье метод является простым и осуществим в большинстве научно-исследовательских лабораторий. При этом он дает возможность более детально изучить изменения глиальных клеток, вызванные экспериментальным воздействием, что важно для понимания происходящих в мозге процессов. Используя приведенный метод, мы показали наличие полового диморфизма в динамике созревания астроглии в базолатеральном ядре миндалины крыс в период взросления с ювенильного до подросткового возраста. Обнаруженные нами различия могут помочь в выяснении механизмов этиологии психоневрологических заболеваний, имеющих половую диспропорцию представленности в социуме.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом № 23-25-00463.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Этическое одобрение. Все эксперименты с животными проводились в соответствии с этическими принципами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и Приказа № 267 МЗ РФ от 19 июня 2003 г. в области

защиты и использования животных в экспериментальных исследованиях. Протокол эксперимента утвержден Этической комиссией ИВНД и НФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dennison M., Whittle S., Yücel M., Vijayakumar N., Kline A., Simmons J., Allen N.B. // *Dev. Sci.* 2013. V. 16. P. 772–791. doi:10.1111/desc.12057.
- Fish A.M., Nadig A., Seidlitz J., Reardon P.K., Mankiw C., McDermott C.L., Blumenthal J.D., Clasen L.S., Lalonde F., Lerch J.P., Chakravarty M.M., Shinohara R.T., Raznahan A. // *NeuroImage*. 2020. V. 204. P. 116122. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.116122.
- Verwer R.W.H., Van Vulpen E.H.S., Van Uum J.F.M. // *J. Comp. Neurol.* 1996, 376, 75–96. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<75::AID-CNE5>3.0.CO;2-L.
- Arruda-Carvalho M., Wu W.-C., Cummings K.A., Clem R.L. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. P. 2976–2985. doi:10.1523/JNEUROSCI.3097-16.2017.
- Wierenga L.M., Bos M.G.N., Schreuders E., Vd Kamp F., Peper J.S., Tamnes C.K., Crone E.A. // *Psychoneuroendocrinology*. 2018. V. 91. P. 105–114. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.02.034.
- Frere P.B., Vetter N.C., Artiges E., Filippi I., Miranda R., Vulser H., Paillère-Martinot M.-L., Ziesch V., Conrod P., Cattrell A., Walter H., Gallinat J., Bromberg U., Jurk S., Mennigen E., Frouin V., Papadopoulos Orfanos D., Stringaris A., Penttilä J., Van Noort B., Grimmer Y., Schumann G., Smolka M.N., Martinot J.-L., Lemaître H. // *NeuroImage*. 2020. V. 210. P. 116441. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.116441.
- Simerly R.B., Swanson L.W., Chang C., Muramatsu M. // *J. Comp. Neurol.* 1990. V. 294. P. 76–95. doi:10.1002/cne.902940107.
- Cahill L., Uncapher M., Kilpatrick L., Alkire M.T., Turner J. // *Learn. Mem.* 2004. V. 11. P. 261–266. doi:10.1101/lm.70504.
- Cooke B.M., Stokas M.R., Woolley C.S. // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 501. P. 904–915. doi:10.1002/cne.21281.
- Kilpatrick L.A., Zald D.H., Pardo J.V., Cahill L.F. // *NeuroImage*. 2006. V. 30. P. 452–461. doi:10.1016/j.neuroimage.2005.09.065.
- Clarke L.E., Barres B.A. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. V. 14. P. 311–321. doi:10.1038/nrn3484.
- Nägler K., Mauch D.H., Pfrieder F.W. // *J. Physiol.* 2001. V. 533. P. 665–679. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.00665.x.
- Pfrieder F.W., Barres B.A. // *Science*. 1997. V. 277. P. 1684–1687. doi:10.1126/science.277.5332.1684.
- Johnson R.T., Breedlove S.M., Jordan C.L. // *Astrocytes in the Amygdala / In Vitamins & Hormones*. Elsevier, 2010. Vol. 82. P. 23–45. doi:10.1016/S0083-6729(10.82002-3.
- Mong J.A., Kurzweil R.L., Davis A.M., Rocca M.S., McCarthy M.M. // *Horm. Behav.* 1996. V. 30. P. 553–562. doi:10.1006/hbeh.1996.0058.
- Milner T.A., McEwen B.S., Hayashi S., Li C.J., Reagan L.P., Alves S.E. // *J. Comp. Neurol.* 2001. V. 429. P. 355–371.
- Johnson R.T., Breedlove S.M., Jordan C.L. // *J. Comp. Neurol.* 2013. V. 521. P. 2298–2309. doi:10.1002/cne.23286.
- Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogievetsky E., Valeeva G., Mitrukhina O., Manent J.-B., Represa A. // *Front. Neuroanat.* 2015. V. 9. doi:10.3389/fnana.2015.00161.
- Paxinos G., Watson C. // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3. ed. / Academic Press: San Diego, Calif., 1997.
- Martinez F.G., Hermel E.E.S., Xavier L.L., Viola G.G., Riboldi J., Rasia-Filho A.A., Achaval M. // *Brain Res.* 2006. V. 1108. P. 117–126. doi:10.1016/j.brainres.2006.06.014.
- Conejo N.M., González-Pardo H., Cimadevilla J.M., Argüelles J.A., Díaz F., Vallejo-Seco G., Arias J.L. // *J. Neurosci. Res.* 2005. V. 79. P. 488–494. doi:10.1002/jnr.20372.
- Immenschuh J., Thalhammer S.B., Sundström-Poromaa I., Biegon A., Dumas S., Comasco E. // *Biol. Sex Differ.* 2023. V. 14. P. 54. doi:10.1186/s13293-023-00541-8.
- Brenner M., Messing A. // *ASN Neuro.* 2021. V. 13. P. 175909142098120. doi:10.1177/1759091420981206.
- Khan M.M., Hadman M., Wakade C., De Sevilla L.M., Dhandapani K.M., Mahesh V.B., Vadlamudi R.K., Brann D.W. // *Endocrinology*. 2005. V. 146. P. 5215–5227. doi:10.1210/en.2005-0276.
- Elmariah S.B., Hughes E.G., Oh E.J., Balice-Gordon R.J. // *Neuron Glia Biol.* 2004. V. 1. P. 339–349. doi:10.1017/S1740925X05000189.
- Bushong E.A., Martone M.E., Jones Y.Z., Ellisman M.H. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 183–192. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002.
- Reeves A.M.B., Shigetomi E., Khakh B.S. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. P. 9353–9358. doi:10.1523/JNEUROSCI.0127-11.2011.
- Bondi H., Bortolotto V., Canonico P.L., Grilli M. // *Neurobiol. Aging*. 2021. V. 100. P. 59–71. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2020.12.018.
- Tavares G., Martins M., Correia J.S., Sardinha V.M., Guerra-Gomes S., Das Neves S.P., Marques F., Sousa N., Oliveira J.F. // *Brain Struct. Funct.* 2017. V. 222. P. 1989–1999. doi:10.1007/s00429-016-1316-8.
- Baldwin K.T., Murai K.K., Khakh B.S. // *Trends Cell Biol.* 2023. S0962892423002040. doi:10.1016/j.tcb.2023.09.006.

31. Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A. // Trends Neurosci. 2003. V. 26. P. 523–530. doi:10.1016/j.tins.2003.08.008.
32. Krebs-Kraft D.L., Hill M.N., Hillard C.J., McCarthy M.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2010. V. 107. P. 20535–20540. doi:10.1073/pnas.1005003107.
33. Mohr M.A., Michael N.S., DonCarlos L.L., Sisk C.L. // Dev. Cogn. Neurosci. 2022. V. 57. P. 101141. doi:10.1016/j.dcn.2022.101141.
34. Johnson R.T., Schneider A., DonCarlos L.L., Breedlove S.M., Jordan C.L. // J. Comp. Neurol. 2012. V. 520. P. 2531–2544. doi:10.1002/cne.23061.

A Simple Method for Morphological Assessment of Astrocytes: Sexual Dimorphism in The Maturation Dynamics of Astrocytes in the Rat Amygdala

A. O. Manolova¹, N. A. Lazareva¹, A. E. Paramonova¹, A. A. Kvichansky¹, M. S. Odrinskaya¹, M. Yu. Stepanichev¹, and N. V. Gulyaeva¹

¹*Federal state budget institution Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

Simple, affordable and reliable methods for assessing the status of brain structures maturation are vital for preclinical studies related to the effects of early-life stress. These methods make it possible to evaluate the effectiveness of specific therapies or the prevention of stress-related pathological changes. The morphology of astrocytes is one of the markers representing functional state of synapses and thus it is indicative of maturation state of neuronal networks. We performed the method for evaluating the morphological characteristics of astrocytes using epifluorescence microscopy and the ImageJ program. Application of the method to brain sections of rats on postnatal days 18 and 30 revealed the dynamics of morphological changes in the astrocytes of the basolateral nucleus of the amygdala during normal ontogenesis. The proposed method makes it possible to evaluate not only the density of the cell population, but also their morphological parameters associated with the degree of branching and the length of the astrocyte processes. The approach used revealed sexual dimorphism in the ontogenesis: the length of the astrocytic processes increased during maturation from juvenile to pubertal period in the basolateral nucleus of the amygdala only in female rats, but not in males.

Keywords: astroglia, digital image processing, basolateral amygdala, sexual dimorphism, ontogenesis

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. А. Яковлев^{1, 2, *}, Т. А. Дружкова¹, Н. А. Соловьева³, А. Б. Гехт¹,
Н. В. Гуляева^{1, 2}

¹Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича”, Москва, Россия

*E-mail: al_yakovlev@ihna.ru

Поступила в редакцию 18.11.2022 г.

После доработки 07.12.2022 г.

Принята к публикации 08.12.2022 г.

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) в последнее время стали важным объектом для изучения. Предполагается, что посредством ЭВ в организме осуществляется межклеточная коммуникация, в том числе регулирование экспрессии генов, управление такими процессами, как пролиферация и дифференцировка, а также многое другое. Также показана важная роль ЭВ в патологии. Важным практическим применением ЭВ считается их использование в качестве маркеров различных патологических состояний. В настоящее время понимание молекулярных механизмов действия ЭВ весьма ограничено, не в последнюю очередь в связи с методическими сложностями изучения этих объектов. В первую очередь стоит отметить, что не существует стандартизованного метода выделения ЭВ, а это является проблемой для более глубокого изучения ЭВ. Мы попытались подобрать наиболее приемлемый метод выделения ЭВ из сыворотки крови. Для этого ЭВ были выделены из сыворотки крови с помощью трех методов, после чего с помощью масс-спектрометрии определили белковый состав выделенных ЭВ. У каждого из проверенных методов нашли свои преимущества и свои недостатки, что необходимо учитывать при планировании экспериментов в дальнейшем.

Ключевые слова: экстраклеточные везикулы, сыворотка крови, анализ траектории наночастиц, динамическое светорассеяние, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S1027813324030108, EDN: EРУХVE

ВВЕДЕНИЕ

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) представлены во всех биологических жидкостях и являются довольно большой гетерогенной группой. Фактически, любые окруженные липидным бислоем везикулы, не способные к самовоспроизведению и циркулирующие в биологических жидкостях, можно назвать ЭВ [1]. Все исследованные к настоящему времени типы клеток способны к секреции ЭВ. ЭВ принято подразделять на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Экзосомы являются продуктом секреции клеточной эндозомальной системы и имеют размер 50–150 нм. Микровезикулы являются результатом отщуривания плазматической мембраны клетки, их размер составляет 100–1000 нм. Самым большим

по размеру (400–4000 нм) представителем ЭВ являются апоптотические тельца, образующиеся из клеток как результат их гибели в процессе апоптоза. Также ЭВ часто классифицируют по размеру, малыми ЭВ называются все ЭВ менее 200 нм [1].

ЭВ за последние годы стали востребованным объектом экспериментальных исследований. Популярность ЭВ связана с их несколькими уникальными свойствами. Во-первых, мембрана ЭВ содержит сигнал, предохраняющий ЭВ от фагоцитирования макрофагами [2]. Во-вторых, свойства ЭВ позволяют им проникать через гистогематические барьеры, включая гематоэнцефалический [3]. В-третьих, любые клетки поглощают ЭВ [4]. Все эти свойства очень способствуют тому, чтобы развивать диагностику на основе ЭВ или даже

использовать ЭВ в качестве средства доставки лекарственных препаратов.

В настоящее время не существует стандартизованного метода выделения ЭВ, что, безусловно, является препятствием для дальнейшего развития этого направления. Для выделения ЭВ в основном используются ультрацентрифугирование, ультрафильтрация, гель-фильтрация, преципитация и иммунопреципитация, а также комбинации этих методов. Несколько работ посвящены сравнению существующих методов выделения ЭВ, и они не приходят к единому выводу об эффективности того или иного подхода [5–7]. Как правило, разные методы выделения ЭВ приводят к выделению разных субфракций ЭВ, которые отличаются между собой по составу.

Обычно для выделения ЭВ используют ультрацентрифугирование, гель-фильтрацию, преципитацию полимерами, ультрафильтрацию или иммунопреципитацию. Долгое время золотым стандартом считалось выделение ЭВ с помощью ультрацентрифугирования, но сейчас для выделения ЭВ применяют и другие методы. Гель-фильтрация и преципитация гидрофильными полимерами являются подходящей альтернативой ультрацентрифугированию, отличающейся целым рядом преимуществ. Эти методы обходятся недорого, легко масштабируемы и обладают высокой производительностью.

В настоящее время остается непонятным, какой метод, а точнее, какую комбинацию методов, лучше всего использовать при выделении ЭВ для целей протеомного анализа. Для того, чтобы это выяснить, для выделения ЭВ мы использовали комбинацию гель-фильтрации через Sepharose CL-2B, преципитации с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000, обработки протеазами и ультрафильтрации через мембрану с порогом отсека 100 кДа, после чего определяли белковый состав полученных фракций с помощью масс-спектрометрии.

МЕТОДЫ

Реактивы и материалы. В работе были использованы ПЭГ 6000 (A1387, AppliChem, Германия), фосфатно-солевой буфер PBS (14190-094, Gibco, Великобритания), фильтры 0.45 мкм и фильтры 100 кДа (MCPM45C67, MCP100C41, Pall, Пуэрто-Рико), протеиназа К (ЕК001, Evrogen, Россия), смола для гель-фильтрации Sepharose CL-2B (17014001, Cytiva, США), набор для определения концентрации белка ProteOrange (14102, Lumiprobe, Россия), бычий сывороточный альбумин (BCA, 126609, Calbiochem, США).

Критерии отбора клинического материала. В исследование были включены 8 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 45 лет. От каждого

добровольца было получено письменное информированное согласие. Критериями исключения являлись шизофрения; алкоголизм и наркомания в анамнезе жизни; серьезные неврологические заболевания (инсульт, болезнь Паркинсона, деменция, ушибы мозга, эпилепсия и т.п.); эндокринные нарушения: сахарный диабет, дисфункция щитовидной железы и прием тиреотропных препаратов/заместительной терапии; любое инвалидизирующее заболевание внутренних органов; выраженный дефицит зрения или слуха; значительные физические нагрузки накануне обследования, суточный и ночной графики работы, прием антикоагулянтов и психотропных препаратов в период перед участием в исследовании. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом.

Материал для исследования. Материалом для исследования служила сыворотка крови. Забор крови у участников исследования проводили из локтевой вены натощак в утренние часы. Известно, что на образование ЭВ оказывает влияние множество факторов, так что процедура взятия крови и преаналитический этап подготовки проб были максимально стандартизированы. Для всех проб были соблюдены одинаковые условия, а именно: время и способ забора крови, тип моновет и размер иглы (21,5G); промежуток времени (не более 30 минут) и температура в помещении между взятием крови и центрифугированием (22–23°C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа.

Выделение грубой фракции ЭВ с помощью ПЭГ. Исходный объем образцов составлял 1 мл сыворотки крови. Предварительную очистку образцов проводили с помощью центрифугирования через фильтр 0.45 мкм. Центрифугирование проводили 30 мин 3 000 g при RT. После этого получали грубую фракцию ЭВ с помощью преципитации. Предварительно очищенную сыворотку смешивали 1 к 1 с 6% ПЭГ 6000, тщательно перемешивали и оставляли на 30 мин при 4°C. Затем образцы центрифугировали 1 500 g 30 мин при 4°C. С осадка тщательно отбирали надосадочную жидкость и промывали осадок с помощью PBS. Осадок растворяли в 0.5 мл PBS, это грубая фракция ЭВ.

Обработка грубой фракции ЭВ протеиназой К. Расщепление примесных белков, а также наружных белков ЭВ проводили с помощью протеиназы К (ПК). Концентрация ПК составляла 1 мг/мл, концентрация хлорида кальция 10 мМ, время обработки 60 мин, температура обработки 37°C.

Выделение чистой фракции ЭВ с помощью гель-фильтрации. Гель-фильтрацию проводили на колонке, набитой 10 мл Sepharose CL-2B. На колонку наносили 0.5 мл образца, промывали 3 мл PBS и элюировали ЭВ в 1 мл PBS. Перед следующей пробой колонку промывали 15 мл PBS.

Ультрафильтрация. Концентрирование проводили на фильтрах с порогом отсечения 100 кДа. Образцы центрифугировали 30 мин при 3 000 г при RT. Образцы были сконцентрированы примерно в 10 раз.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли с помощью красителя ProteOrange согласно инструкции производителя. По 1 мкл пробы смешивали с 40 мкл рабочего раствора красителя и прогревали 10 мин при 95°C, после чего пробы охлаждали до комнатной температуры и определяли флуоресценцию при длинах волн возбуждения и испускания 470 и 570 нм, соответственно. Калибровочную кривую строили по растворам БСА.

Динамическое светорассеяние. Динамическое светорассеяние фракции ЭВ определяли с помощью прибора Zetasizer Nano S производства Malvern Panalytical (Великобритания). В пластиковую кювету наливали 100 мкл разведенной в 10 раз в PBS фракции ЭВ и определяли светорассеяние на угол 173 градуса на длине волны 633 нм за четыре повтора длительностью по 10 с каждый. Оборудование позволяет определить число отраженных фотонов, выражаемое в тысячах фотонов в секунду, ксps. Общее число отраженных фотонов используется для построения корреляционной функции для вычисления размера частиц, но может служить и самостоятельным параметром, характеризующим образец. В нашей предыдущей работе мы показали, что число фотонов является вполне надежным показателем, характеризующим число ЭВ в образце.

Анализ траектории наночастиц. Анализ траекторий наночастиц проводили на приборе NanoSight NS300 производства Malvern Panalytical (Великобритания). В качестве источника света в нем используется лазер с длиной волны 488 нм. Свет от лазера входит в проточную кювету, содержащую образец, и рассеивается на объектах размером 50–500 нм. Под углом около 90 градусов к направлению света находится объектив микроскопа, через который все рассеивающие свет частицы снимали на камеру с частотой 25 кадров в секунду. Последующая компьютерная обработка отснятого видео позволяет проследить траекторию движения каждой частицы индивидуально и, используя уравнение Стокса-Эйнштейна из величины перемещения за единицу времени, вычислить размер частицы. Образец постоянно подавали в проточную кювету с помощью шприцевого насоса, что позволяет записать на видео движение большого числа индивидуальных ЭВ. Прибор поддерживает постоянную температуру во время эксперимента. Выделенные ЭВ разводили в PBS в 100 раз и снимали два видео продолжительностью 30 сек каждое, результаты для каждого образца получали усреднением результатов обработки двух видеороликов. При таком разведении в каждом кадре оказывается около

ста индивидуальных частиц. Скорость прокачки образца насосом составляла 60 у.е., так что суммарное число треков на каждом видео составляло около двух тысяч. При компьютерной обработке видео были использованы настройки постобработки, одинаковые для всех образцов, для типичных ЭВ это Blur 5×5, Max jump 12, Min track steps 5.

Пробоподготовка. Экзосомы объемом 50–100 мкл лизировали в двукратном объеме буфера, содержащего 10% SDS в 50 мМ бикарбонате триэтиламония (TEAB). Лизис проводили ультразвуковым шупом на льду 3 раза по 30 сек. Образцы центрифугировали со скоростью 13000 г 10 мин, для осаждения пены SDS.

Для гидролиза белков трипсином с использованием фильтров S-Trap забирали весь доступный объем для образцов. Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей образцы инкубировали в присутствии 4 мМ трис(2-карбоксиил) фосфина (TCEP) и 6.2 мМ 2-хлорацетамида (CAA) при температуре 80°C в течение 30 мин. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры. Добавляли 12% H_3PO_4 в соотношении 1:10 и пипетировали. Добавляли 6 частей S-Trap protein binding buffer (90% водный метанол, содержащий 100 мМ TEAB pH 7.5), хорошо перемешивали и наносили на фильтр S-Trap. После чего центрифугировали в течение 4 мин при 4000 g (повторяли до полного нанесения образца). Промывку осуществляли тем же раствором (S-Trap protein binding buffer) 4 раза, нанося по 150 мкл и центрифугируя в течение 4 мин при 4000 g. Перемещали фильтр в чистую пробирку. Добавляли 40 мкл буфера для гидролиза (трипсин/белок в соотношении 1/25, 50 мМ TEAB). Образцы инкубировали в течение 1.5 ч при температуре 47°C. После инкубации добавляли 40 мкл 50 мМ TEAB и 0.2% муравьиной кислоты, центрифугировали в течение 4 мин при 4000 g. Добавляли 35 мкл 50% ацетонитрила, содержащего 0.2% муравьиной кислоты, и центрифугировали в течение 4 мин при 4000g. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку.

В полученных супернатантах определяли общую концентрацию пептидов методом колориметрического анализа с использованием набора Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Пептиды высушивали и растворяли в 0.1% муравьиной кислоте до конечной концентрации 0.3 мкг/мкл.

Хромато-масс-спектрометрия образцов. Полученные пептиды разделяли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США). Один микролитр пептидной смеси загружали на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0,5 мм × 3 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изографическом

режиме с использованием буфера “С” в качестве подвижной фазы (2% ацетонитрил, 0.1% муравьиной кислоты в деионизованной воде) на ВЭЖХ колонке PeakEfficiency (FE 100 мкм × 30 см, 1.9 мкм размер частиц) (Molecta) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0.1% муравьиной кислоты) и подвижной фазой Б: (80% ацетонитрил, 0.1% водный раствор муравьиная кислота) при скорости потока 0.3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 10 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 68 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 2 мин, после 2 минутной промывки при 99% буфера Б, концентрацию этого буфера линейно снижали до исходных 2% за 3 мин. Общая длительность анализа составляла 90 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX (“Thermo Scientific”, США), как описано ранее [8]. Идентификацию белков проводили при помощи программного обеспечения MaxQuant v. 2.0.3.0 с использованием поискового алгоритма Andromeda [9]. Для идентификации белков использовали базу данных протеома человека в UniProt (UP000005640). Были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 4.5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ± 20 ppm и возможность пропуска двух сайтов расщепления трипсином. Окисление метионинов, ацетилирование N-конца белка и карбамидометилирование цистеина были учтены как возможные и обязательная модификация пептидов, соответственно. При идентификации белков внутри каждой экспериментальной группы выделения эксосом применяли опцию “match between runs” с установками по умолчанию. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков устанавливали пороговую величину FDR (False Discovery Rate) 0.01. Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено, по крайней мере, два пептида. Безметковая количественная оценка содержания белков происходила на основе iBAQ и LFQ.

Статистический анализ и представление результатов. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism ver. 12. Графическое представление результатов масс-спектрометрического анализа создано с помощью программы FunRich ver. 3.1.3. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ или тест Хи-квадрат, множественное сравнение корректировали с помощью поправки Бонферрони. В качестве апостериорного

теста использовали тест Манна-Уитни. Достоверным считали уровень значимости меньше 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Самым простым и доступным методом выделения ЭВ является, видимо, преципитация ПЭГ. К достоинствам этого метода также относится высокая производительность метода. Недостаток преципитации с помощью ПЭГ также очевиден – высокая доля примесных белков во фракции ЭВ. Гель-фильтрация позволяет избавиться от некоторой части примесных белков, но при этом является довольно трудозатратной и трудно масштабируемой процедурой. Основную задачу по избавлению от примесей призвана выполнить обработка ЭВ протеазами, в частности ПК. Последовательность этих методов была применена нами для выделения ЭВ с целью отработки наиболее пригодного метода выделения ЭВ, в первую очередь характеризующегося минимальным наличием примесных неэкзосомальных белков.

Основные характеристики ЭВ, выделенных с помощью разных методов, представлены в таблице 1. В общем, мы вправе заключить, что полученные результаты являются вполне ожидаемыми. Преципитация ПЭГ ожидаемо позволяет выделить максимальное число частиц с самой высокой концентрацией белка. Гель-фильтрация значительно снижает как число частиц, так и количество белка в них ($p < 0.05$ по тесту Манна-Уитни). Обработка ПК на общее число частиц не влияет, но достоверно снижает количество белка ($p < 0.05$ по тесту Манна-Уитни).

Другой важнейшей характеристикой ЭВ является размер частиц. Используемые методы позволяют предполагать, что после преципитации мы будем иметь частицы размером до примерно 200 нм, а после гель-фильтрации частицы не меньше примерно 70 нм. Полученные нами ЭВ попадают в ожидаемые диапазоны размеров частиц (табл. 1). Однако, два метода оценки размеров частиц дают плохую согласованность результатов для ЭВ, полученных преципитацией ПЭГ. Возможно, это наблюдение является следствием большого количества примесей в этой фракции. Примеси, вероятнее всего белки, за счет взаимодействия с везикулами могут замедлять их движение в кювете прибора. А такое не связанное с размером замедление движения частиц в растворе алгоритм обработки данных трактует как увеличение размеров частиц. Для более чистых фракций результаты определения размеров частиц неплохо совпадают для двух использованных методов (табл. 1).

При анализе данных ДРС и АТН нами вновь был подмечено наличие высокодостоверной корреляции между числом частиц (АТН) и числом рассеянных фотонов (ДРС) (данные не представлены).

Таблица 1. Основные характеристики ЭВ, выделенных с использованием разных методов.

Группа	Число частиц в мл, $\times 10^6$	Размер частиц, нм (ДРС)	Размер частиц, нм (АТН)	Количество белка, мкг (ЭВ из 1 мл сыворотки)
Преципитация ПЭГ	16.0 \pm 4.4	138.7 \pm 42.4	184.9 \pm 11.2	108.2 \pm 10.9
Гель-фильтрация после преципитации ПЭГ	4.1 \pm 1.4	120.4 \pm 18.6	134.8 \pm 6.3	17.5 \pm 10.1
Гель-фильтрация после преципитации ПЭГ и обработки ПК	6.4 \pm 2.1	128.4 \pm 9.5	129.1 \pm 3.0	3.2 \pm 1.6

Таким образом, мы воспроизвели результаты одного из своих прошлых экспериментов [10], позволившие нам утверждать, что с помощью метода ДРС можно быстро и достаточно надежно определять концентрацию ЭВ в достаточно чистых образцах. Естественно, сказанное не относится к образцам исходной сыворотки, как, вероятно, и других биологических жидкостей сложного состава, так как высокая концентрация примесей практически наверняка будет мешать определению истинной концентрации ЭВ. В своих экспериментах, даже при минимальной очистке ЭВ с помощью ПЭГ, мы с хорошей точностью определяем концентрацию ЭВ по числу рассеянных фотонов на ДРС.

Основной задачей проведенного эксперимента было определение белкового состава полученных разными методами ЭВ. Во фракциях, как и следовало ожидать, было идентифицировано несколько сотен белковых молекул. Полный состав фракций представлен в приложении (таблицы S1–S3). Число генов, продукты которых представлены во фракциях ЭВ, полученных разными методами, представлено на рис. 1. Обращает на себя внимание тот факт, что после обработки ЭВ с помощью ПК и последующей гель-фильтрации, число белков,

идентифицированных в этой фракции с помощью масс-спектрометрии, уменьшилось практически вдвое. Возможно, обработка ПК не столь безобидна, как могло казаться ранее, и в этом процессе происходит некоторое разрушение конститутивных белков ЭВ. Однако более вероятна иная трактовка, а именно, ПК расщепляет примесные белки во фракции ЭВ.

Основной интерес представляет собой качественный состав белков, выделенных в составе ЭВ разными методами. Представление качественного разнообразия белков представляет собой определенную проблему, так как белки принимают участие во многих взаимодействиях и редко соотносятся только с одним процессом. Локализация белков является более точной характеристикой разнообразия белков, хотя, конечно, и неполной. Именно локализацию мы выбрали в качестве характеристики полученного нами разнообразия белков. На рис. 2 представлен процент генов, идентифицированные продукты которых имеют, согласно базе данных FunRich, локализацию либо в экзосомах, либо в экстраклеточных компартментах, либо принадлежат к экстраклеточным белкам. Понятно, что один и тот же белок может входить в каждую категорию, так что суммарный процент может превышать 100%. При этом только для этих трех локализаций происходит достоверное обогащение белков во фракции ЭВ, выделенных всеми тремя методами. То есть выделяя ЭВ мы обогащаем белки только из этих трех фракций и никаких иных, фактически мы видим, что каждый из этих методов пригоден для выделения ЭВ. Конкретно с фракцией экзосом связано 60–70% выделенных нами белков. Существенная часть белков, непосредственно не связанных с экзосомами, принадлежит тем не менее либо к другим экстраклеточным компартментам, либо является растворимыми экстраклеточными белками. Экстраклеточные компартменты включают в себя, например, и неэкзосомальные везикулы, такие как микрочастицы, а растворимые экстраклеточные белки могут выделяться вместе с ЭВ, так как, например, образуют околосомальную белковую корону. Таким

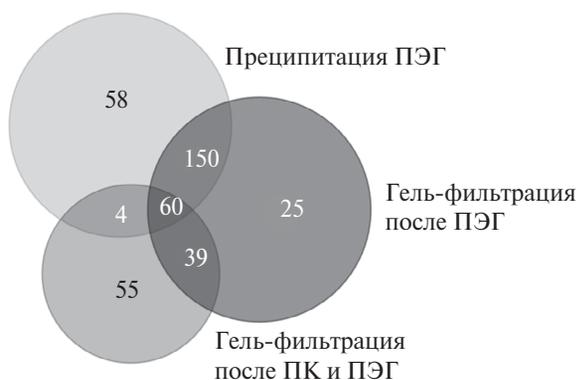


Рис. 1. Анализ протеома ЭВ, выделенных разными методами. Число белков, идентифицированных с помощью масс-спектрометрического анализа, представлено на диаграмме Венна.

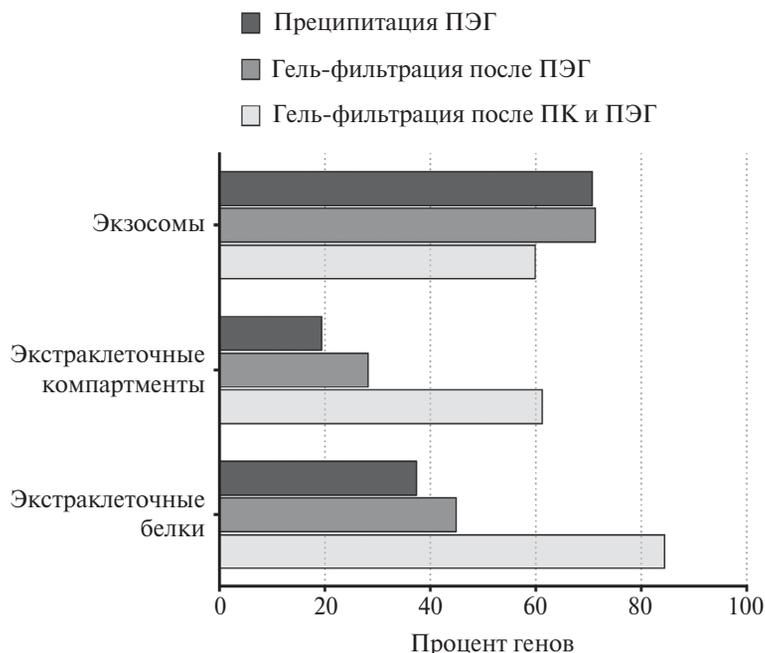


Рис. 2. Локализация белков, выявленных во фракции ЭВ, согласно базе данных FunRich. Показаны только те компартменты, белки которых достоверно обогащаются при выделении ЭВ. Во всех представленных компартментах для всех способов выделения происходит достоверное обогащение белков с достоверностью $p < 0.001$ по тесту Хи-квадрат с поправкой Бонферрони на множественные сравнения.

образом, и не истинно экзосомальные белки также могут быть частью фракции ЭВ.

С использованием трех методов выделения ЭВ были получены фракции, несколько различающиеся по белковому составу. Однако за единичными исключениями все выделенные белки, а это продукты 272 генов при выделении с помощью ПЭГ, 274 генов при выделении с помощью ПЭГ и гель-фильтрации и 158 генов при выделении с помощью ПЭГ, обработки ПК и гель-фильтрации, принадлежат к белкам ЭВ согласно базе данных Vesiclepedia.

Еще одним результатом работы оказалось, что при любом методе выделения ЭВ не удастся полностью избавиться от липопротеинов. В частности, среди тех белков, которые выделяются всеми из использованных методов (таких белков 60), выявляются альбумин, трансферрин, аполипопротеины В, Е, А1 и С. Для объяснения этого результата, видимо, стоит опираться на последние данные, убедительно свидетельствующие о том, что ЭВ, находясь в сыворотке, всегда увенчаны белковой короной [11]. Аполипопротеины, альбумин, трансферрин, судя по всему, как раз и являются неотъемлемой частью этой короны [12, 13]. Таким образом, стоит заключить, что ЭВ нельзя очистить от целого ряда белков, не являющихся истинно везикулярными, по крайней мере, если применять только методы, сохраняющие белки в нативном состоянии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все использованные нами методы выделения ЭВ пригодны для применения в тех или иных целях. Грубая преципитация с помощью ПЭГ имеет высокую производительность и подходит для изучения ЭВ в широком диапазоне размеров, от нескольких десятков до сотен нм. В эту фракцию входят, видимо, и частицы размером менее 50 нм, то есть не обязательно экзосомы и не микровезикулы. Возможно, именно эта фракция окажется информативной для решения той или иной научной задачи. Применение гель-фильтрации после преципитации существенно снижает число частиц (за счет наиболее мелких, до примерно 70 нм) и в еще большей степени количество белка во фракции ЭВ. Видимо, этот метод выделяет ЭВ вместе с нековалентно связанными белками и вероятно подходит для изучения взаимодействия ЭВ с клетками-реципиентами, так как такие ЭВ содержат на мембране весь спектр белков, присутствующих на ЭВ в сыворотке (или иной исходной биологической жидкости). Дополнительная обработка ПК драматически снижает общее число белков и их концентрацию во фракции ЭВ. Такой метод подойдет для исследования собственно ЭВ, без подавляющего большинства белков, ассоциированных с ЭВ в исходном образце.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность компании КДСО за предоставленную возможность использования приборной базы компании и лично сотрудникам КДСО С.Л. Васину и Е.О. Дуплякину за помощь в разработке оптических методов детекции ЭВ. Авторы также благодарят ЦКП “Протеом человека” ИБМХ, на базе которого был проведен протеомный анализ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-20112).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thery C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K., et al. // J. Extracell. Vesicles. 2018. V. 7. № 1.*
2. *Belhadj Z., He B., Deng H.L., Song S.Y., Zhang H., Wang X.Q., Dai W.B., Zhang Q. // J. Extracell. Vesicles. 2020. V. 9. № 1.*
3. *Khaspekov L.G., Yakovlev A.A. // Neurochem. J. 2023. V. 39. № 1. P. 1–18.*
4. *van Niel G., Carter D.R.F., Clayton A., Lambert D.W., Raposo G., Vader P. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2022. V. 23. № 5. P. 369–382.*
5. *Brennan K., Martin K., FitzGerald S.P., O’Sullivan J., Wu Y., Blanco A., Richardson C., Mc Gee M.M. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1.*
6. *Dong L., Zieren R.C., Horie K., Kim C.-J., Mallick E., Jing Y., Feng M., Kuczler M.D., Green J., Amend S.R., Pienta K.J., Xue W. // J. Extracell. Vesicles. 2020. V. 10. № 2.*
7. *Visan K.S., Lobb R.J., Ham S., Lima L.G., Palma C., Edna C.P.Z., Wu L.-Y., Gowda H., Datta K.K., Hartel G., Salomon C., Möller A. // J. Extracell. Vesicles. 2022. V. 11. № 9.*
8. *Novikova S., Shushkova N., Farafonova T., Tikhonova O., Kamyshinsky R., Zgoda V. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 18. P. 1–29.*
9. *Tyanova S., Temu T., Cox J. // Nat. Protoc. 2016. V. 11. № 12. P. 2301–2319.*
10. *Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Nikolaev R.V., Kuznetsova V.E., Gruzdev S.K., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // Neurochem. J. 2019. V. 13. № 4. P. 385–390.*
11. *Yerneni S.S., Solomon T., Smith J., Campbell P.G. // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2022. V. 1866. № 2.*
12. *Tóth E., Turiák L., Visnovitz T., Cserép C., Mázló A., Sódar B.W., Försönits A.I., Petóvári G., Sebestyén A., Komlósi Z., Drahos L., Kittel Á., Nagy G., Bácsi A., Dénes Á., Gho Y.S., Szabó-Taylor K., Buzás E.I. // J. Extracell. Vesicles. 2021. V. 10. № 11.*
13. *Wolf M., Poupardin R.W., Ebner-Peking P., Andrade A.C., Blöchl C., Obermayer A., Gomes F.G., Vari B., Maeding N., Eminger E., Binder H.M., Raninger A.M., Hochmann S., Brachtl G., Spittler A., Heuser T., Ofir R., Huber C.G., Aberman Z., Schallmoser K., Volk H.D., Strunk D. // J. Extracell. Vesicles. 2022. V. 11. № 4.*

Comparison of Methods for Isolation of Extracellular Vesicles from Human Serum

A. A. Yakovlev^{1, 2}, T. A. Druzhkova¹, N. A. Solovyeva³, A. B. Guekht¹, and N. V. Gulyaeva^{1, 2}

¹Scientific and Practical Psychoneurological Center named after Z.P. Solovyov DZM, Moscow, Russia

²Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Extracellular vesicles (EVs) have recently become an important object of study. It is assumed that through EVs in the body, intercellular communication is carried out, including the regulation of gene expression, the control of proliferation and differentiation, and much more. The important role of EV in pathology is also shown. An important practical application of EVs is their use as markers of various pathological conditions. At present, the understanding of the molecular mechanisms of action of EVs is very limited, not least due to the methodological difficulties of studying these objects. First of all, it should be noted that there is no standardized method for isolating EVs, and this is a problem for a deeper study of EVs. We tried to choose the most appropriate method for isolating EVs from blood serum. For this, EVs were isolated from blood serum using three methods, after which the protein composition of the isolated EVs was determined using mass spectrometry. Each of the methods used has its own advantages and disadvantages, which must be taken into account when planning experiments in the future.

Keywords: extracellular vesicles, blood serum, nanoparticle tracking analysis, dynamic light scattering, mass spectrometry