

ISSN 1027-8133

Том 40, Номер 3

Июль - Август - Сентябрь
2023



НЕЙРОХИМИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 3, 2023

Вклад ученых Сибири в нейрохимию России

(спецвыпуск, часть I)

Редакторы Б. М. Доронин, Н. Н. Дыгало, Н. Г. Колосова

Обзоры

Метаболическая пластичность развивающегося и стареющего головного мозга	
А. Б. Салмина	197
Маркеры нейродегенерации при болезни Паркинсона	
М. А. Никитина, В. М. Алифирова, С. О. Бородина, Е. С. Королёва	211

Экспериментальные работы

Влияние культивирования <i>in vitro</i> и переноса эмбрионов на плотность нейронов и нейрогенез в головном мозге мышей линии C57BL/6J	
Е. Ю. Брусенцев, Т. Н. Игонина, И. Н. Рожкова, С. В. Окотруб, Д. А. Лебедева, Е. В. Владимирова, В. С. Козенева, С. Я. Амстиславский	223
Длительный опыт агрессии изменяет экспрессию генов в гипоталамусе самцов мышей двух линий	
А. А. Сапронова, П. Э. Кисаретова, Р. Салман, Н. П. Бондарь	234
Ингибитор JNK (с-Jun N-терминальной киназы) IQ-1S подавляет преждевременное старение мозга крыс OXYS	
А. А. Жданкина, А. Н. Осипенко, Д. И. Тихонов, С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, А. И. Хлебников, Н. Г. Колосова	245
Различия в изменениях активности системы глутамат/ГАМК в сетчатке крыс при старении и развитии ретинопатии в ночное время и днем	
Д. В. Телегина, А. К. Антоненко, Н. Г. Колосова	257
Быстрые изменения экспрессии активной каспазы-3 и рецепторов глюкокортикоидов в клетках стриатума при нейровоспалении	
В. В. Булыгина, Г. Т. Шишкина, Д. А. Ланшаков, Т. С. Калинина, Н. П. Комышева, У. С. Дрозд, Е. В. Сухарева, Н. Н. Дыгало	265
Активность серотонинергических нейронов дорсального ядра шва необходима для проявления антидепрессантного действия кетамина	
У. С. Дрозд, Д. А. Ланшаков, Н. Н. Дыгало	273
Влияние субхронической алкоголизации на поведение и моноаминергические системы мозга мышей с предрасположенностью к депрессивноподобному поведению	
Д. В. Базовкина, Е. М. Кондаурова, С. Н. Адонина, Е. Ю. Баженова, А. В. Куликов	281

Клиническая нейрохимия

Роль полиморфизмов генов *TNF-α*, *TNFRSF1A* и *CD40* при рассеянном склерозе в популяции Томской области

М. А. Титова, В. М. Алифирова, Н. Ф. Мусина, Т. Н. Николаева

292

Особенности изменений экзогенных белков теплового шока (HSP 27 и HSP 70) у пациентов с профессиональной патологией нервной системы

Г. М. Бодиенкова, Е. В. Боклаженко

299

Contents

Vol. 40, no. 3, 2023

The Contribution of Siberian Scientists to the Neurochemistry of Russia

(Special Issue, Part 1)

Eds. B. M. Doronin, N. N. Dygalo, and N. G. Kolosova

Review Articles

Metabolic Plasticity of a Developing and Aging Brain

A. B. Salmina 197

Markers of Neurodegeneration in Parkinson's Disease

M. A. Nikitina, V. M. Alifirova, S. O. Borodina, and E. S. Koroleva 211

Experimental Articles

Effect of *In Vitro* Culture and Embryo Transfer on Neuronal Density and Neurogenesis in the Brain of C57BL/6J Mice

E. Yu. Brusentsev, T. N. Igonina, I. N. Rozhkova, S. V. Okotrub, D. A. Lebedeva, E. V. Vladimirova, V. S. Kozeneva, and S. Ya. Amstislavsky 223

Repeated Experience of Aggression Changes Gene Expression in Hypothalamus in Male Mice of Two Strains

A. A. Sapronova, P. E. Kisaretova, R. Salman, and N. P. Bondar 234

JNK (c-Jun N-Terminal Kinase) Inhibitor IQ-1S Suppresses Premature Aging of OXYS Rat Brain

A. A. Zhdankina, A. N. Osipenko, D. I. Tikhonov, S. V. Logvinov, M. B. Plotnikov, A. I. Khlebnikov, and N. G. Kolosova 245

Differences in Changes in the Glutamate/GABA System Activity in the Rat Retina during Aging and the Development of Retinopathy at Nighttime and Daytime

D. V. Telegina, A. K. Antonenko, and N. G. Kolosova 257

Rapid Changes in the Expression of Active Caspase-3 and Glucocorticoid Receptors in Striatum Cells Induced by Neuroinflammation

V. V. Bulygina, G. T. Shishkina, D. A. Lanshakov, T. S. Kalinina, N. P. Komysheva, U. S. Drozd, E. V. Suhareva, and N. N. Dygalo 265

Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neurons Activity is Necessary for the Manifestation of the Antidepressant Effect of Ketamine

U. S. Drozd, D. A. Lanshakov, and N. N. Dygalo 273

Effect of Subchronic Alcoholization on the Behavior and Monoaminergic Systems of the Brain of Mice with a Predisposition to Depression-Like Behavior

D. V. Bazovkina, E. M. Kondaurova, S. N. Adonina, E. Yu. Bazhenova, and A. V. Kulikov 281

Clinical Neurochemistry

The Role of *TNF- α* , *TNFRSF1A*, and *CD40* Genes Polymorfisms
in Multiple Sclerosis in Tomsk Region

M. A. Titova, V. M. Alifirova, N. F. Musina, and T. N. Nikolaeva

292

Features of Changes in Exogenous Heat Shock Proteins (HSP 27 and HSP 70)
in Patients with Occupational Nervous System Pathology

G. M. Bodienkova and E. V. Boklazhenko

299

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ И СТАРЕЮЩЕГО ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2023 г. А. Б. Салмина^{1, 2, *}

¹ Научный центр неврологии, Москва, Россия

² Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.

После доработки 27.02.2023 г.

Принята к публикации 28.02.2023 г.

Нейропластичность — фундаментальное свойство головного мозга, в основе которого лежат различные виды межклеточных взаимодействий (синаптическая активность, нейритогенез, синаптогенез и элиминация синапсов, нейрон-глиальные взаимодействия), развитие, дифференцировка, миграция и гибель клеток (нейрогенез/глиогенез и гибель клеток нейрональной и глиальной природы, ангиогенез и регрессия микрососудов), адаптация метаболизма к меняющимся условиям внешней среды. В обзоре на основе данных литературы и результатов собственных исследований обсуждаются вопросы регуляции некоторых видов энергетического метаболизма (гликолиз, митохондриальное дыхание) в клетках нейрональной, глиальной, эндотелиальной природы, сигнальные функции метаболитов в нервной ткани, механизмы формирования церебральной инсулинорезистентности, псевдогипоксии и связанного с ними нейровоспаления при патологии головного мозга, а также перспективы поиска молекул-маркеров патофизиохимических процессов, ассоциированных с нарушениями метаболической пластичности в развивающемся и стареющем головном мозге.

Ключевые слова: головной мозг, метаболизм, энергопродукция, развитие мозга, старение мозга, нейродегенерация, псевдогипоксия

DOI: 10.31857/S1027813323030159, **EDN:** YVEKVG

Список сокращений:

АДФ — аденозиндифосфат
АТФ — аденозинтрифосфат
ГЭБ — гематоэнцефалический барьер
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ — интерлейкин
НАД⁺(Н) — никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)
НВЕ — нейроваскулярная единица
НСК — нейральная стволовая клетка
НПК — нейральная прогениторная клетка
Аβ — бета-амилоид (amyloid-beta)
APP — белок-предшественник амилоида (amyloid precursor protein)
BACE-1 — бета-секретаза 1 (betasecretase 1)
CAT — транспортер аминокислот (cationic aminoacid transporter)

CD — кластер дифференцировки (cluster of differentiation)
Cx — коннексин (connexin)
Fe65 — адапторный белок
GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acid protein)
GLUT — транспортер глюкозы (glucose transporter)
GPR81 — рецептор лактата (G protein-coupled receptor 81)
GSK3β — киназа гликогенсинтазы 3-бета (glycogen synthase kinase 3-beta)
H2AX — гистон H2 (H2A histone family member X)
HIF-1 — гипоксия-индуцибельный транскрипционный фактор (hypoxia-inducible factor-1)
IRAP — инсулин-регулируемая аминопептидаза (insulin-regulated aminopeptidase)
IRS1 — субстрат рецептора инсулина (insulin receptor substrate-1)
MAPK — митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase)

* Адресат для корреспонденции: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80, e-mail: allasalmina@mail.ru.

МСТ — монокарбоксилатный транспортер (monocarboxylate transporter)

NLRP — инфламасома (Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing)

PKC — протеинкиназа C (protein kinase C)

RAGE — рецепторы конечных продуктов гликирования (receptor for advanced glycation end-products)

SIRT — сиртуин (sirtuin)

VEGFR — рецептор сосудисто-эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor receptor)

Нейропластичность — фундаментальное свойство головного мозга, в основе которого лежат различные виды межклеточных взаимодействий (синаптическая активность, нейритогенез, синаптогенез и элиминация синапсов, нейрон-глиальные взаимодействия), развитие, дифференцировка, миграция и гибель клеток (нейрогенез/глиогенез и гибель клеток нейрональной и глиальной природы, ангиогенез и регрессия микрососудов), адаптация метаболизма к меняющимся условиям внешней среды (изменение доминирующего процесса генерации АТФ в клетках). Несмотря на то, что традиционно нейропластичность ассоциируется с синаптической коммуникацией и процессами нейрогенеза, накапливается все больше данных о том, что не меньший вклад в этот механизм вносит метаболическая пластичность [1, 2]. Клетки головного мозга — нейроны, астроциты, микроглия, олигодендроциты и их предшественники, клетки эндотелия церебральных микрососудов, стволовые и прогениторные клетки, нейробласты — отличаются друг от друга преимущественным использованием того или иного вида метаболических процессов для энергопродукции, функциональной активности и восстановления [3], причем метаболический профиль этих клеток значимо меняется в зависимости от этапа развития организма, действия внешних стимулов, характера питания, состояния микроциркуляции, суточных ритмов и многих других факторов [4–7].

УТИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗЫ И ПЛАСТИЧНОСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Известно, что в силу высокой потребности в энергии (до четверти от энергозатрат всего организма) головной мозг нуждается в постоянно протекающих реакциях гликолиза (доминирует в астроцитах, стволовых и прогениторных клетках нейрогенных ниш, реактивной микроглии, зрелых олигодендроцитах), окислительного фосфорилирования (преобладает в зрелых нейронах, покоящейся микроглии, клетках церебрального эндотелия, клетках-предшественниках олигодендроглии) [3]. Межклеточные взаимодействия существен-

ным образом “корректируют” метаболические запросы и возможности клеток. В литературе на протяжении последних двух десятилетий активно обсуждается вопрос вклада нейрон-астроглиального метаболического сопряжения, опосредованного лактат-продуцирующей активностью астроглии, в контроль возбудимости нейронов: с одной стороны, транспорт лактата из астроцитов и его конверсия в пировуват в активированных нейронах актуальны для поддержания механизмов пластичности, ответственных за запоминание и обучение [8], с другой стороны, роль этого механизма в суммарную метаболическую пластичность ткани головного мозга может быть переоценена [9]. Развивающийся головной мозг в меньшей степени зависит от глюкозы как от энергетического субстрата, но по мере развития и индукции механизмов пластичности потребление глюкозы возрастает. Вместе с тем, известно, что потребление глюкозы клетками головного мозга, оцениваемое по кислород-глюкозному индексу, адекватно маркирует разные стадии развития мозга или его активности: в раннем возрасте этот показатель составляет 4.1 вследствие высокой активности гликолитических процессов и преимущественного использования лактата в качестве энергетического субстрата, во взрослом мозге в состоянии покоя этот параметр возрастает до 5.5 вследствие доминирования окислительного фосфорилирования, но на фоне активации падает до 5.0 из-за возрастания вклада гликолитической продукции лактата в энергообеспечение мозга [10–12].

В этом контексте следует акцентировать внимание на нескольких важных аспектах проблемы: а) способность клеток головного мозга эффективно утилизировать глюкозу или альтернативные источники энергии (например, кетоновые тела) в развивающемся мозге, по мере старения и при прогрессировании нейродегенерации; б) сигнальные функции метаболитов, высвобождающихся во внеклеточное пространство; в) молекулы-маркеры патофизиохимических процессов, ассоциированных с нарушениями метаболической пластичности в развивающемся и стареющем головном мозге.

Общепризнанным фактом является то, что клетки головного мозга гетерогенны по своим метаболическим потребностям и по мере развития головного мозга они существенным образом меняются [13, 14]. Мы показали, что перинатальная гипоксия/ишемия экспериментальных животных приводит к изменению количества клеток, экспрессирующих транспортер глюкозы (GLUT4) и монокарбоксилатные транспортеры МСТ1 и МСТ4, участвующие в переносе лактата в клетки и во внеклеточное пространство. Нейроны гиппокампа, коры и миндалевидного тела после перенесенной перинатальной гипоксии имеют редуцированную экспрессию GLUT4, тогда как астроциты в этих ре-

гионах увеличивают экспрессию МСТ1, что, вероятно, носит приспособительный характер и обеспечивает дополнительные возможности для утилизации глюкозы астроцитами и поставки образующегося лактата к нейронам развивающегося мозга. Примечательно, что эти события сопровождаются увеличением экспрессии транспортеров глюкозы на клетках церебрального эндотелия микрососудов соответствующего региона головного мозга, интенсификации репаративного неоангиогенеза, изменением метаболизма НАД⁺ за счет aberrантной экспрессии НАД⁺-гликогидролазы/CD38, а также прогрессирующим восстановлением когнитивных функций на фоне сохраняющейся повышенной тревожности. Подобные изменения механизмов утилизации глюкозы и транспорта лактата были подтверждены и в моделях нейроваскулярной единицы/гематоэнцефалического барьера *in vitro* [15–19].

Существенный вклад в обеспечение биодоступности энергетических субстратов вносит гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), клетки которого (эндотелиоциты, перicyты, периваскулярная астроглия) экипированы широким спектром транспортеров аминокислот, глюкозы, лактата [20, 21]. Само развитие ГЭБ (барьерогенез) во-многом контролируется метаболизмом клеток церебрального эндотелия, перicyтов и периваскулярной астроглии, в том числе интенсивностью гликолиза в этих клетках и особенностями транспорта лактата в пределах нейроваскулярной единицы (НВЕ) [22]. Участие клеток эндотелия и эндотелиальных прогениторных клеток в ангиогенезе/барьерогенезе подразумевает перестройку процессов гликолитической продукции АТФ и окислительного фосфорилирования к этим клеткам, отличающихся относительно высоким содержанием митохондрий [23]. В развивающемся головном мозге экспрессионный профиль клеток ГЭБ имеет некоторые особенности, например, транспортер глюкозы GLUT1 в клетках церебрального эндотелия важен для процессов ангиогенеза в раннем постнатальном периоде развития [24], тогда как в стареющем головном мозге или на фоне прогрессирования нейродегенерации альцгеймеровского типа его экспрессия уменьшается [25]. Транспортер аминокислот CAT1, участвующий в переносе молекулы аргинина, на клетках эндотелия церебральных микрососудов максимально активен в развивающемся (первые 14 суток постнатального развития крыс) головном мозге, а затем его экспрессия прогрессивно снижается [26]. Экспрессия монокарбоксилатного транспорта МСТ1, переносящего лактат или пируват в клетки и из клеток, в эндотелии микрососудов также максимальна в развивающемся головном мозге экспериментальных животных и снижается по мере созревания (по окончании периода вскармливания животных) [27]. Мы установили, что экспрессия в клетках церебрального эндотелия рецепторов лактата GPR81 и транспортеров лак-

тата МСТ1, обеспечивающих захват лактата из внеклеточной среды, уменьшается при развитии нейровоспаления вирусного генеза *in vitro*, что может быть ответственным за прогрессирование митохондриальной дисфункции и повышение проницаемости ГЭБ [28, 29]. Интересно, что похожие изменения зарегистрированы в клетках церебрального эндотелия при токсическом действии бета-амилоида *in vitro*: снижение активности митохондрий вследствие блокады МСТ, что предотвращается активацией GPR81 рецепторов лактата [30]. Таким образом, логично предположить, что повреждение клеток церебрального эндотелия при нейровоспалении, сопровождающем развитие нейроинфекций или хронической нейродегенерации, связано с недостаточной активностью GPR81 рецепторов и подавлением механизмов поступления молочной кислоты в клетки. Кроме того, лактат-опосредованные механизмы важны для барьерогенеза: стимуляция лактатом GPR81 рецепторов и транспорт лактата монокарбоксилатными транспортерами МСТ1 на клетках церебрального эндотелия в HIF-1-зависимой манере способствует поддержанию целостности формирующегося ГЭБ в развивающемся головном мозге, причем длительная стимуляция GPR81 рецепторов *in vitro* в дозозависимой манере приводит к интенсификации митохондриального биогенеза на фоне подавления экспрессии монокарбоксилатных транспортеров МСТ1 и функционально сопряженного с ними белка CD147 в церебральных эндотелиоцитах [31]. Подавление экспрессии HIF-1 в нейрональных и астроглиальных клетках в составе НВЕ развивающегося головного мозга изменяет транспорт лактата, митохондриальную активность и пролиферацию, но активность эндотелиоцитов в такой модели частично стабилизирует пролиферативный потенциал нейронов и астроцитов [32].

Важно отметить, что лактат может выступать в качестве глiotрансмиттера, регулирующего активность нейронов [33], проницаемости ГЭБ [34], микроциркуляцию в активных регионах мозга [35]. Продукция лактата в гиппокампе поддерживает процессы пластичности при обучении и запоминании [36], а синаптическая активность нейронов сопровождается HIF-1-зависимой интенсификацией гликолиза и увеличением продукции лактата, важного для нейритогенеза [37]. Таким образом, синаптическая активность нейронов головного мозга, ангиогенез и барьерогенез ассоциированы с изменением экспрессии молекул, маркирующих эффективность астроцит-эндотелиального и нейрон-астроглиального метаболического сопряжения, опосредованного лактатом, что нарушается после перенесенного перинатального повреждения. Нами было продемонстрировано, что период восстановления неврологического дефицита у экспериментальных животных при перинатальной гипоксии головного мозга или после перене-

сенного стресса раннего периода жизни (в модели сепарации новорожденных от матери) соответствует появлению клеточных и молекулярных маркеров нейровоспаления, репаративного ангиогенеза, изменению характера экспрессии про- и антиангиогенных молекул астроглиальной природы, изменению экспрессии транспортеров лактата и глюкозы в клетках эндотелия и периваскулярных астроцитах, обратимым изменениям проницаемости ГЭБ в коре и гиппокампе [17, 38, 39].

Известно, что в ткани головного мозга на протяжении всего онтогенеза сохраняются клетки, имеющие метаболические особенности, приближенные к таковым у клеток в эмбриональном периоде развития. Это нейральные стволовые и прогениторные клетки (НСК/НПК) нейрогенных ниш, ответственные за механизмы постнатального нейрогенеза, которые демонстрируют зависимость от биодоступности лактата в качестве ключевого энергетического субстрата. Действительно, НСК/НПК обычно используют гликолиз и окисление жирных кислот для поддержания своей популяции, но будучи стимулированными к пролиферации и дифференцировке, начинают генерировать энергию преимущественно за счет окислительного фосфорилирования в митохондриях, что сопровождается интенсификацией продукции активных форм кислорода [3, 40]. Расположенные в нишах зрелые астроциты и клетки церебрального эндотелия, с одной стороны, являются “поставщиками” необходимых энергетических субстратов для НСК/НПК, с другой стороны, могут выступать в качестве “сенсоров” локального микроокружения, влияющего на метаболизм в нише. В модели нейрогенной ниши гиппокампа *in vitro* с использованием гиппокампальных нейросфер, полученных от мышей возрастом 10–14 суток, мы ранее показали, что оптогенетическая стимуляция GFAP-экспрессирующих клеток приводит к значимому снижению экспрессии MCT1 на присутствующих в нише Nestin-иммунопозитивных, но не GFAP-иммунопозитивных НСК/НПК, что сопровождалось увеличением внеклеточной концентрации лактата [41]. Вероятно, подавление экспрессии транспортеров MCT1, которые могут переносить лактат в обоих направлениях через цитоплазматическую мембрану, на Nestin⁺GFAP[−] клетках, принадлежащих к более зрелым прогениторам (в гиппокампальной нейрогенной нише GFAP-иммунопозитивные клетки соответствуют зрелым астроцитам и покоящимся или медленно делящимся НСК, а Nestin-иммунопозитивные клетки — клеткам радиальной глии и амплифицирующимся НПК) [42–44], необходимо для снижения поступления лактата в клетки при их рекрутинге и вступлении в нейрогенез, сопровождающемся, как было упомянуто выше, подавлением гликолиза и активацией митохондриального дыхания. Более того, интактные гиппокампальные нейросферы,

имеющие сохранный уровень экспрессии MCT1, подавляют неоангиогенез *in vitro* с участием клеток эндотелия церебральных микрососудов [45], что весьма логично объясняется их MCT1-опосредованным захватом лактата из внеклеточной среды и соответствующим сокращением биодоступности молочной кислоты для рядом расположенных пролиферирующих клеток эндотелиальной природы. Действительно, при оптогенетической стимуляции GFAP⁺ клеток в уже упомянутой *in vitro* модели нейрогенной ниши мы зарегистрировали усиленную мобилизацию клеток с высоким пролиферативным потенциалом, частичное восстановление нейрогенного потенциала НСК/НПК, подвергшихся токсическому действию бета-амилоида (A β), а при имплантации клеток нейрогенной ниши после фотоактивации в органотипическую культуру гиппокампа *in vitro* — увеличение экспрессии в GFAP⁺ и Nestin⁺ клетках коннексина 43 (Cx43), транспортирующего из клеток лактат и/или НАД⁺ [46], и снижение экспрессии CD38, выступающего в качестве НАД⁺-конвертирующего фермента — НАД⁺-гликогидролазы [41, 42], что соответствует описанной выше стратегии: снижение внутриклеточной концентрации лактата (и, вероятно, повышение уровня НАД⁺) важно для активизации митохондриального дыхания и пролиферации рекрутированных НСК/НПК.

ПСЕВДОГИПОКСИЯ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КАК РЕЗУЛЬТАТ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ КЛЕТОК НВЕ

Известно, что увеличение продукции лактата клетками может быть связано со стабилизацией и активацией в клетках гипоксия-индуцибельного транскрипционного фактора HIF-1, контролирующего экспрессию белков-транспортеров глюкозы, ферментов утилизации глюкозы в реакциях гликолиза, транспортеров лактата [47], что, в частности, критически важно для нейрон-астроглиального метаболического сопряжения, церебрального ангиогенеза и барьерогенеза [48]. Гипоксия любого генеза приводит к HIF-1-зависимой активации использования глюкозы клетками головного мозга и подавлению дыхания в митохондриях [49]. Похожий механизм препятствует реализации нейротоксического эффекта A β [50], хотя собственно гипоксия и HIF-1-опосредованные механизмы могут вносить вклад в прогрессирование нейродегенерации альцгеймеровского типа [51], а увеличенная концентрация лактата вызывает гиперэкспрессию АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK) и способствует аккумуляции альфа-синуклеина (α -syn) в ткани при другом виде нейродегенерации — экспериментальной болезни Паркинсона [52].

Уместно упомянуть о том, что несмотря на высокий уровень окислительных процессов в ткани головного мозга, напряжение кислорода в ней не слишком высоко: от 15 мм рт. ст. в мозолистом теле до 32 мм рт. ст. в таламусе экспериментальных животных (кора и гиппокамп занимают промежуточное положение), причем в эмбриональном периоде этот параметр еще ниже (до 8 мм рт. ст.), а в нейрогенных нишах уровень кислорода флуктуирует в соответствии с активностью микрососудов, богато представленных в этих микрорегионах мозга, достигая 6–8 мм рт. ст. в субгранулярной зоне гиппокампа и 42–48 мм рт. ст. в субвентрикулярной зоне [53]. Интересно, что умеренная гипоксия *in vitro* (15–38 мм рт. ст.) способствует пролиферации и дифференцировке НСК, аналогичные эффекты регистрируются и при моделировании гипоксического повреждения головного мозга у животных *in vivo* [54, 55]. Эффекты HIF-1, активируемого при гипоксии, отчасти ответственны за индукцию пролиферации и дифференцировки, а также апоптоза клеток нейрогенных ниш [56]. Однако в неклассических нейрогенных нишах, например, в среднем мозге, гипоксия может вызывать противоположный эффект и тормозить пролиферацию и дифференцировку клеток *in vivo* [57]. Весьма вероятно, что такие различия в поведении клеток нейрогенных ниш *in vivo* могут быть вызваны применением разных протоколов индукции гипоксии.

Еще один важный механизм регуляции уровня утилизации глюкозы и продукции лактата в тканях опосредован действием инсулина. В контексте метаболизма глюкозы, основной эффект инсулина в чувствительных к нему тканях связан с увеличением экспрессии глюкозного транспортера GLUT4, повышением транспорта глюкозы в клетки, интенсификацией ее метаболизма в реакциях гликолиза и последующей утилизацией пирувата (цикл трикарбоновых кислот и дыхательная цепь митохондрий) [58]. Традиционная точка зрения о том, что головной мозг относится к категории инсулин-независимых тканей в настоящее время уступила место концепции инсулин-опосредованных механизмов регуляции пластичности мозга при обучении, запоминании, принятии решений, контроле пищевого поведения, нарушении которых регистрируется при разных видах хронической нейродегенерации [59–62]. Развитие митохондриальной дисфункции в клетках НВЕ, характерное для патогенеза болезни Альцгеймера [63, 64], также может быть напрямую связано с нарушениями инсулин-опосредованных механизмов метаболической пластичности. Мы показали на животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера, что нейродегенерация альцгеймеровского типа характеризуется увеличением экспрессии гена, кодирующего инсулин, в гиппокампе и миндалевидном теле, что сопро-

вождается увеличением уровня инсулина мозгового происхождения, дисметаболизмом глюкозы и нарастанием уровня лактата, аккумуляцией маркера двуцепочечных разрывов ДНК (H2AX) в нейронах гиппокампа, увеличением экспрессии адаптерного белка Fe65 в клетках эндотелия церебральных микрососудов [65]. Такие события ассоциированы с aberrантной экспрессией белков, участвующих во внутриклеточной сигнальной трансдукции при активации рецепторов инсулина: повышение экспрессии самих инсулиновых рецепторов, а также субстрата инсулинового рецептора-1 (IRS1), митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK3-beta) и протеинкиназы C (PKC), снижение коэкспрессии инсулин-регулируемой аминопептидазы (IRAP) и транспортера глюкозы 4 (GLUT4) [66–68], свидетельствующей о развитии локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга. В нейронах снижение уровня комплекса IRAP/GLUT4 сопровождается увеличением трансмембранного митохондриального потенциала. Параллельно нарастают признаки нейровоспаления, которое маркируется повышением проницаемости ГЭБ, увеличением экспрессии инфламмасом NLRP3 в клетках глии и продукта их активности — ИЛ-18 [69], усиливаются неоангиогенез и нарушения локальной микроциркуляции [70], увеличивается экспрессия рецепторов конечных продуктов гликирования белков (RAGE) в клетках церебрального эндотелия [71], что способствует формированию эндотелиальной дисфункции и сопровождается прогрессированием церебральной амилоидной ангиопатии. Все указанные механизмы запускаются на фоне проявления характерных для болезни Альцгеймера нарушений когнитивных функций и поведения (повышение уровня тревожности и заторможенности, нарушение социальных контактов и взаимодействий, а также пространственного, социального и ассоциативного обучения и запоминания) [72].

Мы показали, что блокирование активности NLRP3 инфламмасом (у NLRP3–/–мышей) в клетках НВЕ подавляет проявления церебральной инсулинорезистентности [73], что в совокупности с другими экспериментальными и клиническими данными [74, 75] позволяет по-новому взглянуть на патогенез и терапию неврологического дефицита при ускоренном старении головного мозга, характерного для нейродегенерации альцгеймеровского типа [76–78].

Признавая NLRP3 в качестве интегратора метаболической дисфункции (локальной инсулинорезистентности) и воспаления, функционально сопряженного с другими важными сигнальными путями, логично предположить, что этот вид инфламмасом может выступать не только в качестве маркера повреждения клеток при нейродегенерации, но и в качестве молекулы-мишени для

фармакотерапии. Однако, следует учитывать, что некий “базальный” уровень экспрессии NLRP3 в ткани головного мозга может быть важен для пластичности, коль скоро у NLRP3-нокаутных мышей регистрируются тревожность, нарушения процессов запоминания, снижение гиппокампального нейрогенеза, аберрантная возбудимость клеток гиппокампа и миндалевидного тела [79].

Инфламмасы NLRP3 являются медиаторами эффектов HIF-1 в клетках головного мозга при гипоксии/ишемии, в том числе индукции апоптоза/пироптоза этих клеток [80]. В антиген-презентирующих клетках (макрофагах) гипоксия напрямую увеличивает экспрессию NLRP3 и продукцию ИЛ-1 в инфламмасах каспаза-зависимым механизмом, на основании чего авторы предположили, что именно NLRP3 инфламмасы выступают в качестве внутриклеточных “сенсоров” энергетического кризиса, вызванного подавленным гликолизом вследствие гипоксии или депривации глюкозы [81].

По аналогии с этими данными, мы полагаем, что нарушение процессов утилизации глюкозы в ткани головного мозга вследствие прогрессирующей церебральной инсулинорезистентности, а также развивающийся энергетический кризис в клетках НВЕ являются “триггерами” сборки NLRP3 инфламмаса и усиленной продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-18). Эти события можно интерпретировать как развитие псевдогипоксии, которая характерна для некоторых тканей при сахарном диабете/инсулинорезистентности [82].

Одним из важных маркеров псевдогипоксии является нарушение соотношения НАД⁺ и НАДН в клетках, связанное с истощением уровня НАД⁺ и преобладанием восстановленной формы (НАДН) [83]. В этих условиях развивается т.н. редуktивный стресс, что имеет своим результатом подавление гликолиза, цикла Кребса и окислительного фосфорилирования для снижения генерации НАДН. Примечательно, что редуktивный стресс может предшествовать развитию окислительного стресса на пресимптоматической стадии развития болезни Альцгеймера [83, 84], в а экспериментальных моделях нейродегенерации альцгеймеровского типа он вызывает нарушения нейритогенеза, нейрогенеза и аккумуляцию фосфорилированного тау-белка в клетках [85]. Кроме того, значительное снижение уровня НАД⁺ в клетках — одно из характерных проявлений патобиохимических механизмов старения, в частности, снижение уровня НАД⁺ в ядре клеток по мере старения организма вызывает псевдогипоксическое состояние и нарушает процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях [86].

Нарушение процессов образования АТФ приводит к стабилизации HIF-1 и активации экспрес-

сии генов, находящихся под его контролем, в том числе бета-секретазы 1 (BACE-1), ответственной за генерацию А β из белка-предшественника амилоида (APP) [87]. Это означает, что в тех случаях болезни Альцгеймера, когда амилоидогенный путь избыточно активен не вследствие активирующих мутаций в генах, кодирующих BACE-1 или пресенилина-1, он может быть индуцирован формированием псевдогипоксии в ткани головного мозга из-за церебральной инсулинорезистентности и сопутствующей активации HIF-1-опосредованных механизмов (гиперактивация BACE-1, усиленная экспрессия NLRP3, интенсификация гликолиза, изменение митохондриальной динамики в клетках).

Вместе с тем, именно эти события в пределах НВЕ могут быть ответственны, например, за повышение проницаемости ГЭБ и нарушение церебрального ангиогенеза [88, 89]. С одной стороны, увеличение экспрессии рецепторов сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGFR) на клетках эндотелия и индукция неоангиогенеза — результат увеличения экспрессии HIF-1 [90], а увеличение локальной концентрации лактата, как описано выше, также стимулирует ангиогенез. С другой стороны, вазодилатация и локальная гиперемия — это закономерная реакция микроциркуляторного русла на гипергликемию и тканевую гипоксию, связанная с увеличением соотношения НАДН/НАД⁺, как это было продемонстрировано в контексте патогенеза псевдогипоксического состояния в тканях при сахарном диабете и его осложнений [91]. Следовательно, описанный в литературе [92] и наблюдаемый в наших экспериментах [70] феномен гиперваскуляризации с формированием аберрантных микрососудов с повышенной проницаемостью ГЭБ при экспериментальной болезни Альцгеймера, а также и при других видах хронической нейродегенерации [93], может иметь своей причиной псевдогипоксию в ткани головного мозга. В отдельных регионах головного мозга, например, в субвентрикулярной области, это может носить адаптивный характер: формирование новых микрососудов с повышенной проницаемостью с несовершенным барьерогенезом и повышенной проницаемостью ГЭБ важно не только для формирования про-нейрогенного микроокружения и рекрутинга НСК/НПК [94], но и для образования новых нейрогенных ниш вдоль стенки желудочка, как это было показано ранее в ишемизированном мозге [95].

НАД⁺/НАДН — ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ПЛАСТИЧНОСТИ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В различных тканях, в том числе в ткани нервной системы, поддержание уровня НАД⁺ является важным компонентом гомеостаза, который обеспе-

чивается работой НАД⁺-синтезирующих ферментов (например, никотинамидфосфорибозилтрансферазы) и НАД⁺-конвертирующих ферментов (например, НАД⁺-гликогидролазы (CD38/CD157), моно(АДФ-рибозил)трансферазы, поли(АДФ-рибозил)полимеразы, гистоновых деацетилаз – сиртуинов), а также сопряженными с ними функционально транспортными системами, например, коннексиновыми и паннексиновыми (полу)каналами [3, 46, 96, 97]. Восстановление молекулы НАД⁺ обеспечивается в реакциях гликолиза, окисления жирных кислот, цикле трикарбоновых кислот, тогда как окисление НАДН – в реакциях окислительного фосфорилирования в митохондриях, в гликолизе при конверсии пирувата в лактат [98]. Уровни НАД⁺ в клетке варьируют от 70 мкМ в цитозоле до 110 мкМ в ядре (митохондрии занимают промежуточное положение – порядка 90 мкМ) [98], однако есть и другие данные о том, что на долю митохондриального пула НАД⁺ может приходиться от 40 до 70% НАД⁺ в клетке, что составляет для митохондрий порядка 400 мкМ в сравнении с ядром и цитоплазмой – до 100 мкМ в каждом, и такие различия во внутриклеточных пулах обусловлены неспособностью НАД⁺ или НАДН проходить через клеточные мембраны [99].

Поддержание баланса окисленных и восстановленных пиридиновых нуклеотидов в клетке обеспечивает участие НАД⁺ и НАДН в регуляции самых разнообразных внутриклеточных событий – продукция АДФ-рибозы, необходимой для посттрансляционной модификации клеточных белков, в том числе гистонов, генерация вторичных посредников (циклическая АДФ-рибоза, О-ацетил-АДФ-рибоза), обеспечение окислительного фосфорилирования в митохондриях, поддержание редокс-гомеостаза и антиоксидантной защиты, участие в работе клеточных дегидрогеназ, регуляция процессов репликации и репарации ДНК, процессинга РНК, экспрессии генов, циркадного цикла, обеспечение митохондриальной активности [96, 98, 100, 101].

Примечателен вклад НАД⁺ и НАДН в регуляцию активности гликолиза, продукты активности которого, как было обсуждено выше, играют важную роль в пластичности головного мозга. Так, продукт каталитической конверсии НАД⁺ – АДФ-рибоза – регулирует за счет реакций АДФ-рибозилирования активность ферментов гликолиза (глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназы), транспорта глюкозы в клетки инсулин-зависимыми мембранными транспортерами (GLUT4), синтеза гликогена (GSK-3 β), а также ряда митохондриальных белков (сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза, убихинол-цитохром с-редуктаза, НАДН-убихинон-оксидоредуктаза, АТФ-синтаза) [99, 102]. Установлено, что если потребность клетки в НАД⁺ возрастает в большей степени, чем потребность в АТФ, то это приводит к интенсификации

гликолиза вследствие того, что ресурсов митохондриального дыхания недостаточно для регенерации НАД⁺ [103]. Именно поэтому, например, в пролиферирующих клетках важной задачей является обеспечение условий для (ре)генерации НАД⁺ в процессе гликолиза: высокий запрос на НАД⁺ стимулирует клетки конвертировать пируват в лактат, а высокий запрос на АТФ – утилизировать НАД⁺ в электрон-транспортной цепи митохондрий [103]. Как справедливо сделали вывод авторы этой недавней работы, биодоступность НАД⁺ в клетке, фактически, определяет степень активации гликолиза и продукции лактата, а основной результат подавления гликолиза в клетках – снижение внутриклеточного уровня НАД⁺. Насколько это может быть справедливо по отношению к нейроваскулярной единице головного мозга, клетки которой имеют принципиально отличающиеся параметры энергетического метаболизма и характеризуются разнообразными видами межклеточной коммуникации?

Прежде всего, упомянем о том, что снижение биодоступности внутриклеточного НАД⁺ – характеристика клеток мозга в состоянии нейродегенерации [99, 101, 104]. Это может быть связано как с нарушениями гликолиза, окисления жирных кислот и окислительного фосфорилирования, так и с подавлением реакций синтеза НАД⁺ и избыточной активностью НАД⁺-конвертирующих ферментов: поли(АДФ-рибозил)полимеразы, обеспечивающей репарацию поврежденной ДНК, НАД⁺-гликогидролазы/CD38, участвующей в образовании циклической АДФ-рибозы, необходимой для активации клеток глии [96, 105–107]. Нельзя игнорировать и возможность усугубления состояния псевдогипоксии вследствие потери НАД⁺ из клеток, например, при его высвобождении во внеклеточное пространство через активируемые в клетках при подавлении митохондриального метаболизма коннексиновые полуканалы [108] или вследствие интенсивного гидролиза НАД⁺ в цитозоле при повреждении митохондрий [109].

В некоторых клетках коннексин Сх43 функционально сопряжен с CD38 и обеспечивает транспорт НАД⁺ из клетки к активному сайту этого эктофермента [97, 110]. В нейрогенных нишах головного мозга присутствие НАД⁺ во внеклеточном пространстве может иметь важное значение для контроля процессов пролиферации и дифференцировки НСК/НПК, как это было показано недавно с использованием транскриптомного анализа клеток при экспозиции НАД⁺ [111]. CD38 за счет катализируемой им конверсии НАД⁺ в циклическую АДФ-рибозу вовлечен в процессы развития астроцитов и олигодендроцитов в раннем постнатальном периоде [112], а также в механизм миграции зрелых астроцитов после их активации во взрослом мозге [113]. По мере созревания головного мозга экспрессия CD38 (нейрональная и

глияльная) увеличивается [114]. В специализированных нейронах гипоталамуса и гипофиза этот фермент приобретает функции ключевого регулятора секреции окситоцина [115]. Перинатальная гипоксия/ишемия вызывает значимые изменения экспрессии CD38 и Cx43 в ткани головного мозга в постнатальном периоде, что сопровождается нарушением глутаматергической сигнальной трансдукции [116, 117].

Клетки в составе НВЕ головного мозга взрослых животных отличаются по экспрессии Cx43 и CD38: в неактивных астроцитах присутствует много молекул Cx43, но не CD38, нейроны характеризуются обратным соотношением, в условиях гипоксии многократно увеличивается экспрессия Cx43 и CD38 в астроцитах, снижается экспрессия CD38 в нейронах, тогда как в клетках церебрального эндотелия экспрессия этих молекул не меняется. При экспериментальной болезни Альцгеймера уровень НАД⁺ повышается в ткани гиппокампа у мышей после введения Аβ, при этом концентрация внеклеточного НАД⁺ не меняется, что позволяет предполагать увеличение регенерации внутриклеточного НАД⁺ без его потери во внеклеточное пространство на начальных стадиях развития нейродегенерации, причем в этот период такие события не сопровождаются изменением активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 в ткани гиппокампа [118]. При экспериментальной болезни Паркинсона увеличение экспрессии CD38 и Cx43 в клетках глиальной природы в среднем мозге сопровождается увеличением концентрации лактата в ткани [119]. Блокирование коннексинов вызывает подавление экспрессии CD38 в клетках НВЕ и в физиологических условиях, и при гипоксии [110]. Аналогичным образом, астроциты реагируют увеличением экспрессии и проницаемости коннексиновых полуканалов Cx43, а также экспрессии CD38 в ответ на токсическое действие Аβ [120], при котором мы регистрировали начальное увеличение уровня внутриклеточного НАД⁺ [118], возможно, выступающее в качестве “триггера” увеличения экспрессии НАД⁺-транспортирующего канала и активности НАД⁺-конвертирующего фермента. В экспериментах *in vitro* мы зарегистрировали, что подавление гликолиза при действии ингибитора CD38 на клетки астроглии сопровождается интенсификацией регенерации НАД⁺ в митохондриях неактивированных нейронов и астроцитов, и этот процесс нарушается при токсическом действии Аβ. Митохондриальная активность в клетках нейрональной и эндотелиальной природы оказалась подавлена за счет ингибирования активности Cx43 в астроглии, причем в этих условиях астроциты усиливают продукцию лактата, а в присутствии Аβ такой эффект не реализуется (собственные неопубликованные данные). Кроме того, с учетом наших данных о том, что присутствие лактата во внеклеточном про-

странстве снижает активность митохондрий в клетках эндотелия [30], логично предположить, что вне процесса активации синаптической передачи между нейронами в НВЕ существует обратная зависимость интенсивности гликолиза в астроцитах и митохондриальной активности/регенерации НАД⁺ в нейронах и эндотелиоцитах, которая носит CD38/Cx43-зависимый характер. Вероятно, такой механизм конвертируется в нейрон-астроглиальное метаболическое сопряжение при активации синаптической передачи, чтобы обеспечить гиперпродукцию лактата в гликолитически активных астроцитах и его использование нейрональными митохондриями [121]. Оба механизма чувствительны к повреждающему действию Аβ, поэтому развивающееся при нейродегенерации состояние псевдогипоксии/редуктивного стресса в клетках нейрональной и эндотелиальной природы вызывает компенсаторное увеличение активности гликолиза в астроцитах — по аналогии с тем, как это было описано в клетках других тканей (с целью достижения эффективной регенерации НАД⁺) [122]. Подобный феномен должен иметь место и при физиологическом старении, характеризующемся нарастающей митохондриальной дисфункцией и истощением уровня внутриклеточного НАД⁺ в ткани головного мозга из-за подавления процессов синтеза НАД⁺ либо вследствие высокой активности CD38 и поли(АДФ-рибозил)полимеразы [101, 123]. Действительно, высокая активность CD38 в некоторых типах клеток по мере старения организма является одной из причин подавления активности НАД⁺-зависимых сиртуинов SIRT3 и развития митохондриальной дисфункции [104], и, как мы обсуждали выше, — редуктивного стресса, поэтому увеличение регенерации НАД⁺ в реакциях гликолиза (при подавленной активности митохондрий) может обеспечить компенсацию метаболических нарушений и предотвратить необратимое повреждение клеток.

С учетом накопленных данных о роли дисметаболизма НАД⁺ в патогенезе заболеваний головного мозга, представляются обоснованными попытки применения протоколов, увеличивающих биодоступность НАД⁺ в клетках нейрональной, астроглиальной, эндотелиальной природы, для коррекции нарушений развития головного мозга [124], аберрантного церебрального ангиогенеза в раннем постнатальном периоде [125], нейровоспаления при действии бактериальных агентов [126], когнитивного дефицита, вызванного хронической гипоперфузией головного мозга [127] или нейродегенерацией [128, 129], хотя в ряде случаев результаты могут быть неоднозначными [130].

Следует упомянуть и о том, что некоторые новые терапевтические подходы к коррекции неврологической дисфункции, например, трансплантация митохондрий [131], являются по своей сути попыткой добиться нормализации метаболической

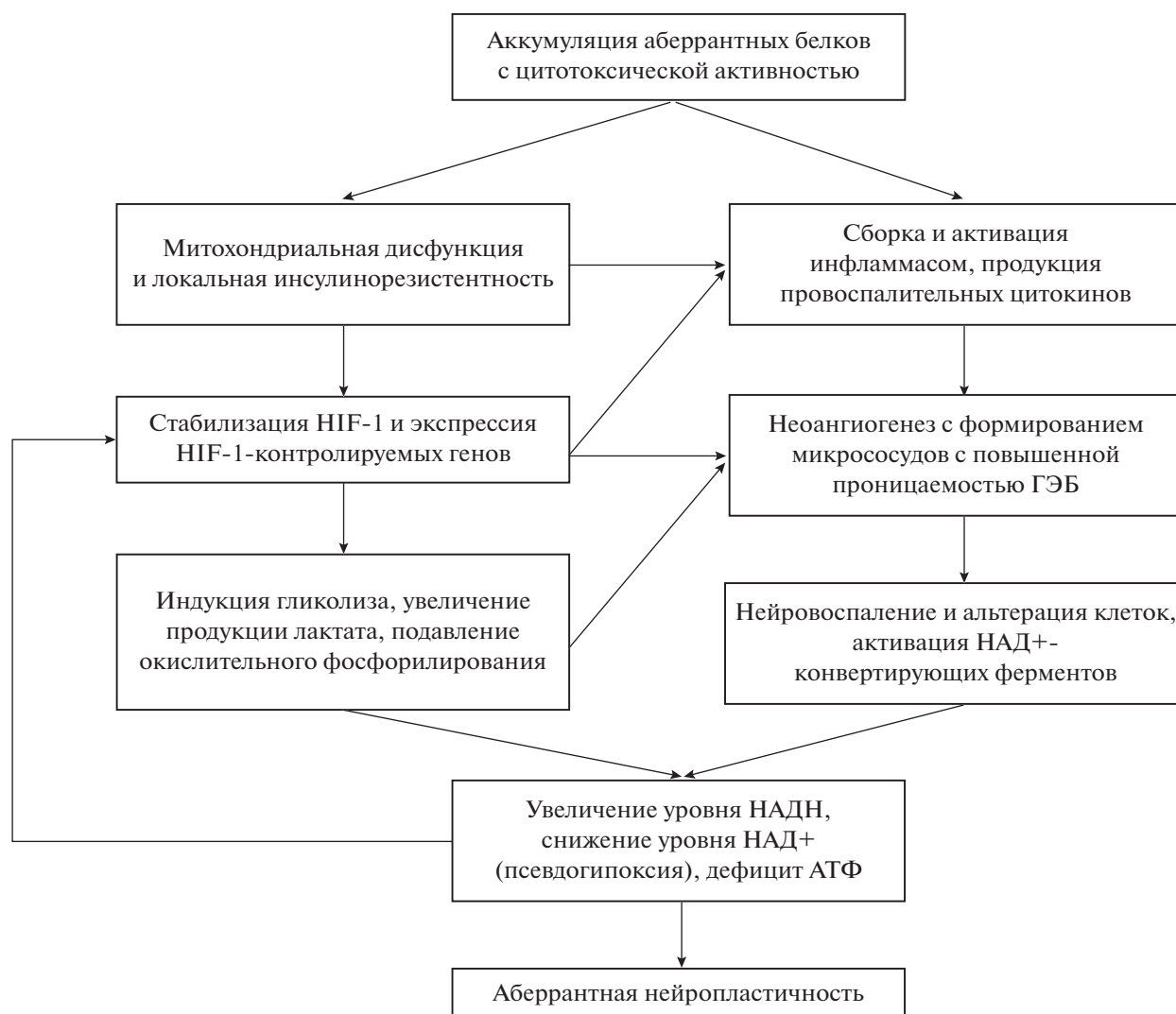


Рис. 1. Нарушения метаболической пластичности ткани головного мозга при хронической нейродегенерации.

пластичности нервной ткани. В этом контексте дополнительно актуализируется роль НАД⁺-гликогидролазы/CD38 в клетках астроглии: этот фермент участвует в реализации их провоспалительного фенотипа [132] и высвобождении во внеклеточное пространство функционально компетентных митохондрий, которые могут быть далее захвачены и использованы рядом расположенными нейронами, например, при ишемии у животных *in vivo* [133]. Оценка уровня митохондрий в диализате головного мозга животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера свидетельствует о нарушении их высвобождения во внеклеточное пространство [134], а при подавлении гликолиза в астроцитах *in vitro* их способность высвобождать митохондрии во внеклеточное пространство существенно редуцирована, что соответствует снижению каталитической активности астроцитар-

ной НАД⁺-гликогидролазы/CD38 (собственные неопубликованные данные).

Современные модели ткани головного мозга *in vitro* позволяют изучать многие аспекты метаболической пластичности развивающегося и стареющего головного мозга, в том числе при ускоренном старении, свойственном нейродегенерации [135]. Традиционно такие модели включают в себя разные виды клеток, отличающиеся метаболизмом и функциональной активностью, поэтому принципиально важным является использование маркеров, корректно отражающих особенности метаболизма в мультиклеточных ансамблях. Следует учитывать, что оценка соотношения НАДН/НАД⁺ в клетках *in vitro*, а также определение продукции и утилизации метаболитов, влияющих на межклеточные взаимодействия и выполняющих сигнальные функции (например, лактата), чрезвычайно важны для расшифровки механизмов ин-

теграции метаболизма в пластичном головном мозге.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Динамические изменения метаболизма клеток головного мозга — одно из фундаментальных свойств нейропластичности. Различные виды клеток в составе нейроваскулярной единицы обладают разными механизмами генерации энергии, которые могут “переключаться” при активации, что обеспечивает оптимальное энергообеспечение нейронов, глии, клеток церебрального эндотелия необходимое для синаптической передачи, изменения микроциркуляции в активных регионах головного мозга. Клетки нейрогенных ниш также адаптируют свои метаболические потребности при их рекрутинге и индукции пролиферации/дифференцировки. Развивающийся, зрелый и стареющий головной мозг отличаются по своим “предпочтениям” в использовании энергетических субстратов, способам и механизмам регуляции их утилизации, вкладу отдельных видов клеток в процессы энергообеспечения. Состояние хронической нейродегенерации сопровождается развитием церебральной инсулинорезистентности и псевдогипоксии, что маркируется изменением отношения НАДН/НАД⁺, биодоступности НАД⁺ для работы НАД⁺-конвертирующих ферментов, нарушением процессов неоангиогенеза/барьерогенеза, нейрогенеза и прогрессированием нейровоспаления в ткани головного мозга (рис. 1). Изучение патофизиохимических процессов, лежащих в основе нарушений развития или повреждения головного мозга, позволит разработать принципиально новые подходы к терапии и профилактике неврологической дисфункции, ориентированные на нормализацию метаболической пластичности ткани центральной нервной системы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

Развитие исследований в Красноярске в области изучения клеточных и молекулярных механизмов патологии нервной системы было бы невозможно без профессора Валерия Васильевича Иванова (1947–1998) — основателя Красноярской школы патофизиологов. Автор выражает слова благодарности ведущему нейробиологу и нейрофизиологу, профессору Харуширо Хигашида (Япония), а также своим ученикам, чьи экспериментальные исследования в 2000–2022 годах внесли существенный вклад в изучение фундаментальных механизмов пластичности головного мозга в норме и при патологии (д.м.н. Н.А. Малиновская, д.м.н. А.В. Моргун, д.м.н. Ю.К. Комлева, д.б.н. О.Л. Лопатина, к.м.н.

А.Н. Шуваев, к.б.н. Я.В. Горина, к.м.н. Ю.А. Панина, Е.Д. Хилажева, д.б.н. Ю.А. Успенская, к.б.н. Е.А. Тепляшина, А.И. Мосягина, к.фарм.н. Е.В. Харитоновна, к.б.н. А.А. Семенова, Е.В. Лычковская, к.б.н. Е.А. Пожиленкова, к.фарм.н. Н.В. Писарева, к.м.н. А.И. Черных, к.м.н. О.С. Окунева, к.б.н. В.А. Кутяков, к.б.н. Н.С. Шаповал, Е.Б. Бойцова, к.м.н. Н.А. Язуина, О.В. Фролова, к.м.н. А.И. Инжутова и др.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет, что конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mateos-Aparicio P., Rodríguez-Moreno A. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019. V. 13. P. 66.
2. La Rosa C., Parolisi R., Bonfanti L. // *Frontiers in Neuroscience*. 2020. V. 14. P. 75.
3. Salmina A.B., Gorina Y.V., Komleva Y.K., Panina Y.A., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L. // *Biomedicines*. 2021. V. 9. № 9. P. 1092.
4. Klug S., Godbersen G.M., Rischka L., Wadsak W., Pichler V., Klöbl M., Hacker M., Lanzemberger R., Hahn A. // *Communications Biology*. 2022. V. 5. № 1. P. 428.
5. Morita M., Ikeshima-Kataoka H., Kreft M., Vardjan N., Zorec R., Noda M. // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. V. 20. № 4.
6. Düking T., Spieth L., Berghoff S.A., Piepkorn L., Schmidke A.M., Mitkovski M., Kannaiyan N., Hosang L., Scholz P., Shaib A.H., Schneider L.V., Hesse D., Ruhwedel T., Sun T., Linhoff L., Trevisiol A., Köhler S., Pastor A.M., Misgeld T., Sereda M., Hassouna I., Rossner M.J., Odoardi F., Ischebeck T., de Hoz L., Hirrlinger J., Jahn O., Saher G. // *Science Advances*. 2022. V. 8. № 37. P. eabo7639.
7. Spinelli M., Fusco S., Grassi C. // *Frontiers in Neuroscience*. 2019. V. 13. P. 788.
8. Magistretti P.J., Allaman I. // *Nat. Rev. Neurosci*. 2018. V. 19. № 4. P. 235–249.
9. Dienel G.A. // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2012. V. 32. № 7. P. 1107–38.
10. Blazey T., Snyder A.Z., Goyal M.S., Vlassenko A.G., Raichle M.E. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 9. P. e0204242.
11. Magistretti P.J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016. V. 113. № 26. P. 7015–7016.
12. Yellen G. // *Journal of Cell Biology*. 2018. V. 217. № 7. P. 2235–2246.
13. Camandola S., Mattson M.P. // *The EMBO Journal*. 2017. V. 36. № 11. P. 1474–1492.
14. Błaszczak J.W. // *Metabolites*. 2020. V. 10. № 11.
15. Моргун А., Кувачева Н., Хилажева Е., Пожиленкова Е., Горина Я., Малиновская Н., Комлева Ю., Лопатина О., Панина Ю., Гасымлы Э. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016. Т. 161. № 6. С. 723–727.
16. Хилажева Е.Д., Кувачева Н.А., Моргун А.В., Бойцова Е.Б., Малиновская Н.А., Пожиленкова Е.А., Сал-

- мина А.Б. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016. Т. 79. № 12. С. 7–12.
17. Успенская Ю.А., Малиновская Н.А., Волкова В.В., Панина Ю.А., Рябokonь Р.В., Фролова О.В., Салмина А.Б. // Сибирское медицинское обозрение. 2015. № 5 (95). С. 49–54.
 18. Моргуn А.В., Кувачева Н.В., Хилажева Е.Д., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. // Сибирское медицинское обозрение. 2015. № 1 (91). С. 28–31.
 19. Salmina A.B., Okuneva O.S., Malinovskaya N.A., Taranushenko T.E., Morgun A.V., Mantorova N.S., Mikhutkina S.V. // Neurochemical Journal. 2008. V. 2. № 3. P. 215–221.
 20. Zaragoz R. // Frontiers in Physiology. 2020. V. 11. P. 973.
 21. Patching S.G. // Mol. Neurobiol. 2017. V. 54. № 2. P. 1046–1077.
 22. Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L. // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2015. V. 64. P. 174–184.
 23. Malinovskaya N.A., Komleva Y.K., Salmin V.V., Morgun A.V., Shuvaev A.N., Panina Y.A., Boitsova E.B., Salmina A.B. // Frontiers in Physiology. 2016. V. 7. P. 599.
 24. Veys K., Fan Z., Ghobrial M., Bouch A., Garca-Caballero M., Vriens K., Conchinha N.V., Seuwen A., Schlegel F., Gorski T., Crabb M., Gilardoni P., Ardicoglu R., Schaff n rath J., Casteels C., De Smet G., Smolders I., Van Laere K., Abel E.D., Fendt S.M., Schroeter A., Kalucka J., Cantelmo A.R., Wlchli T., Keller A., Carmeliet P., De Bock K. // Circ. Res. 2020. V. 127. № 4. P. 466–482.
 25. Winkler E.A., Nishida Y., Sagare A.P., Rege S.V., Bell R.D., Perlmutter D., Sengillo J.D., Hillman S., Kong P., Nelson A.R., Sullivan J.S., Zhao Z., Meiselman H.J., Wendy R.B., Soto J., Abel E.D., Makshanoff J., Zuniga E., De Vivo D.C., Zlokovic B.V. // Nat. Neurosci. 2015. V. 18. № 4. P. 521–530.
 26. Tachikawa M., Hirose S., Akanuma S.-I., Matsuyama R., Hosoya K.-I. // Microvascular Research. 2018. V. 117. P. 16–21.
 27. Vannucci S.J., Simpson I.A. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. V. 285. № 5. P. E1127–34.
 28. Бойцова Е.Б., Моргуn А.В., Осипова Е.Д., Мартынова Г.П., Салмина А.Б. // Фундаментальная и клиническая медицина. 2020. Т. 5. № 1. С. 8–14.
 29. Бойцова Е., Моргуn А., Мартынова Г., Тохидпур А., Писарева Н., Рузаева В., Салмина А. // Сибирское медицинское обозрение. 2016. № 5 (101). С. 15–23.
 30. Горина Я.В., Хилажева Е.Д., Мосягина А.И., Харитоновна Е.В., Капкаева М.Р., Стельмашук Е.В., Исaeв Н.К., Розанова Н.А., Салмина А.Б. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2022. Т. 108. № 6. С. 712–724.
 31. Хилажева Е., Писарева Н., Моргуn А., Бойцова Е., Таранушенко Т., Фролова О., Салмина А.Б. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2017. Т. 11. № 1. С. 34–39.
 32. Кувачева Н., Моргуn А., Хилажева Е., Бойцова Е., Рузаева В., Шуваев А., Малиновская Н., Пожиленкова Е., Салмина А. // Сибирское медицинское обозрение. 2016. № 2 (98). С. 51–56.
 33. Tang F., Lane S., Korsak A., Paton J.F., Gourine A.V., Kasparov S., Teschemacher A.G. // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 3284.
 34. Osipova E.D., Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Morgun A.V., Pisareva N.V., Malinovskaya N.A., Boitsova E.B., Pozhilenkova E.A., Belova O.A., Salmin V.V., Taranushenko T.E., Noda M., Salmina A.B. // Reviews in the Neurosciences. 2018. V. 29. № 5. P. 567–591.
 35. Hollyer T.R., Bordoni L., Kousholt B.S., van Luijk J., Ritskes-Hoitinga M., Østergaard L. // J. Neurochem. 2019. V. 148. № 6. P. 712–730.
 36. El Hayek L., Khalifeh M., Zibara V., Abi Assaad R., Emmanuel N., Karnib N., El-Ghandour R., Nasrallah P., Bilen M., Ibrahim P., Younes J., Abou Haidar E., Barmo N., Jabre V., Stephan J.S., Sleiman S.F. // J. Neurosci. 2019. V. 39. № 13. P. 2369–2382.
 37. Segarra-Mondejar M., Casellas-Daz S., Ramiro-Pareta M., Muller-Sanchez C., Martorell-Riera A., Hermelo I., Reina M., Aragons J., Martinez-Estrada O.M., Soriano F.X. // The EMBO Journal. 2018. V. 37. № 9. P. e97368.
 38. Салмина А., Комлева Ю., Малиновская Н., Моргуn А., Тепляшина Е., Лопатина О., Горина Я., Харитоновна Е., Хилажева Е., Шуваев А. // Биохимия. 2021. Т. 86. № 6. С. 917–932.
 39. Салмина А., Моргуn А., Кувачева Н., Пожиленкова Е., Солончук Ю., Лопатина О., Комлева Ю., Таранушенко Т. // Современные технологии в медицине. 2014. Т. 6. № 4. С. 213–222.
 40. Knobloch M., Pilz G.A., Ghesquere B., Kovacs W.J., Wegleiter T., Moore D.L., Hruzova M., Zamboni N., Carmeliet P., Jessberger S. // Cell Rep. 2017. V. 20. № 9. P. 2144–2155.
 41. Khilazheva E.D., Morgun A.V., Boytsova E.B., Mosiagina A.I., Shuvaev A.N., Malinovskaya N.A., Uspenskaya Y.A., Pozhilenkova E.A., Salmina A.B. // Biomed. Khim. 2021. V. 67. № 1. P. 34–41.
 42. Моргуn А., Осипова Е., Бойцова Е., Шуваев А., Малиновская Н., Мосягина А., Салмина А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 170. № 12. С. 668–673.
 43. Bernal A., Arranz L. // Cell. Mol. Life Sci. 2018. V. 75. № 12. P. 2177–2195.
 44. Imayoshi I., Sakamoto M., Kageyama R. // Frontiers in Neuroscience. 2011. V. 5. P. 64.
 45. Успенская Ю., Малиновская Н., Моргуn А., Осипова Е., Салмина А. // Фундаментальная и клиническая медицина. 2020. Т. 5. № 3. С. 18–23.
 46. Salmina A.B., Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Lopatina O.L., Komleva Y.K., Malinovskaya N.A., Pozhilenkova E.A. // Rev. Neurosci. 2014. V. 25. № 1. P. 97–111.
 47. Kierans S.J., Taylor C.T. // The Journal of Physiology. 2021. V. 599. № 1. P. 23–37.
 48. Рузаева В., Моргуn А., Хилажева Е., Кувачева Н., Пожиленкова Е., Бойцова Е., Мартынова Г., Таранушенко Т., Салмина А. // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 6. С. 664–669.
 49. Simon M.C. // Cell Metabolism. 2006. V. 3. № 3. P. 150–151.

50. Soucek T., Cumming R., Dargusch R., Maher P., Schubert D. // *Neuron*. 2003. V. 39. № 1. P. 43–56.
51. Correia S.C., Moreira P.I. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2022. V. 42. № 1. P. 3–21.
52. Jiang P., Gan M., Ebrahim A.S., Castanedes-Casey M., Dickson D.W., Yen S.H. // *Neurobiol. Aging*. 2013. V. 34. № 5. P. 1504–1515.
53. Zhang K., Zhu L., Fan M. // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2011. V. 4. P. 5.
54. Zhao T., Zhang C.-P., Liu Z.-H., Wu L.-Y., Huang X., Wu H.-T., Xiong L., Wang X., Wang X.-M., Zhu L.-L., Fan M. // *The FEBS Journal*. 2008. V. 275. № 8. P. 1824–1834.
55. Zhu L.-L., Zhao T., Li H.-S., Zhao H., Wu L.-Y., Ding A.-S., Fan W.-H., Fan M. // *Brain Research*. 2005. V. 1055. № 1. P. 1–6.
56. Zhu L.L., Wu L.Y., Yew D.T., Fan M. // *Mol Neurobiol.* 2005. V. 31. № 1–3. P. 231–42.
57. Wagenführ L., Meyer A.K., Marrone L., Storch A. // *Stem Cells Dev*. 2016. V. 25. № 3. P. 227–38.
58. Krycer J.R., Yugi K., Hirayama A., Fazakerley D.J., Quek L.-E., Scalzo R., Ohno S., Hodson M.P., Ikeda S., Shoji F., Suzuki K., Domanova W., Parker B.L., Nelson M.E., Humphrey S.J., Turner N., Hoehn K.L., Cooney G.J., Soga T., Kuroda S., James D.E. // *Cell Reports*. 2017. V. 21. № 12. P. 3536–3547.
59. Салмина А.Б., Язуина Н.А., Кувачева Н.В., Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Малиновская Н.А., Лопатина О.Л., Моргунов А.В., Пожиленкова Е.А., Окунева О.С. // *Бюллетень сибирской медицины*. 2013. Т. 12. № 5. С. 104–118.
60. Blázquez E., Velázquez E., Hurtado-Carneiro V., Ruiz-Albusac J.M. // *Frontiers in Endocrinology*. 2014. V. 5. P. 161.
61. Cetinkalp S., Simsir I.Y., Ertek S. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2014. V. 12. № 4. P. 553–64.
62. Milstein J.L., Ferris H.A. // *Mol. Metab.* 2021. V. 52. P. 101234.
63. Стефанова Н.А., Колосова Н.Г. // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2016. № 1. С. 6–13.
64. Стефанова Н., Корболина Е., Еришов Н., Погаев Е., Колосова Н. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. Т. 19. № 4. С. 445–454.
65. Горина Я., Хилажева Е., Комлева Ю., Лопатина О., Салмина А. // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2021. Т. 6. № 4. С. 8–21.
66. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. // *Бюллетень сибирской медицины*. 2017. Т. 16. № 4. С. 106–115.
67. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2019. Т. 13. № 4. С. 28–37.
68. Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Салмина А.Б. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2017. Т. 11. № 4. С. 45–51.
69. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Герцог Г.Е., Попова Н.Н., Салмина А.Б. // *Проблемы эндокринологии*. 2015. Т. 61. № 4. С. 43–49.
70. Горина Я.В., Осипова Е.Д., Моргунов А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Салмина А.Б. // *Бюллетень сибирской медицины*. 2020. Т. 19. № 4. С. 46–52.
71. Горина Я., Осипова Е., Моргунов А., Бойцова Е., Лопатина О., Салмина А. // *Цитология*. 2021. Т. 63. № 2. С. 176–183.
72. Горина Я., Комлева Ю., Лопатина О., Черных А., Салмина А. // *Биомедицина*. 2017. № 3. С. 47–59.
73. Komleva Y.K., Potapenko I.V., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Chernykh A., Khilazheva E.D., Salmina A.B., Shuvaev A.N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 21. P. 11588.
74. Хилажева Е.Д., Белозор О.С., Панина Ю.А., Горина Я.В., Мосягина А.И., Васильев А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К. // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2022. Т. 108. № 9. С. 1200–1221.
75. De Felice F.G. // *The Journal of Clinical Investigation*. 2013. V. 123. № 2. P. 531–539.
76. Komleva Y., Chernykh A., Lopatina O., Gorina Y., Lokteva I., Salmina A., Gollasch M. // *Frontiers in Neuroscience*. 2021. V. 14. P. 618395.
77. Горина Я.В., Салмина А.Б., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Федюкович Л.В., Успенская Ю.А., Морозова Г.А., Демко И.В., Петрова М.М. // *Сибирское медицинское обозрение*. 2014. № 4 (88). С. 11–19.
78. Stefanova N., Kozhevnikova O., Vitovtov A., Maksimova K., Logvinov S., Rudnitskaya E., Korbolina E., Muraleva N., Kolosova N. // *Cell Cycle*. 2014. V. 13. № 6. P. 898–909.
79. Komleva Y.K., Lopatina O.L., Gorina I.V., Shuvaev A.N., Chernykh A., Potapenko I.V., Salmina A.B. // *Brain Res.* 2021. V. 1752. P. 147220.
80. Jiang Q., Geng X., Warren J., Eugene Paul Cosky E., Kaura S., Stone C., Li F., Ding Y. // *Neuroscience*. 2020. V. 448. P. 126–139.
81. Watanabe S., Usui-Kawanishi F., Karasawa T., Kimura H., Kamata R., Komada T., Inoue Y., Mise N., Kasahara T., Takahashi M. // *J. Cell. Physiol.* 2020. V. 235. № 10. P. 7554–7566.
82. Балаболкин М., Креминская В., Клебанова Е. // *Проблемы эндокринологии*. 2005. Т. 51. № 3. С. 22–32.
83. Song J., Yang X., Yan L.J. // *Hypoxia (Auckl)*. 2019. V. 7. P. 33–40.
84. Lloret A., Fuchsberger T., Giraldo E., Vina J. // *Current Alzheimer Research*. 2016. V. 13. № 2. P. 206–211.
85. KK S.N., Devarajan A., Karan G., Sundaram S., Wang Q., van Groen T., Monte F.D., Rajasekaran N.S. // *Redox Biol.* 2020. V. 37. P. 101739.
86. Gomes A.P., Price N.L., Ling A.J., Moslehi J.J., Montgomery M.K., Rajman L., White J.P., Teodoro J.S., Wrann C.D., Hubbard B.P. // *Cell*. 2013. V. 155. № 7. P. 1624–1638.
87. Zhang X., Zhou K., Wang R., Cui J., Lipton S.A., Liao F.F., Xu H., Zhang Y.W. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 15. P. 10873–80.

88. *Mentor S., Fisher D.* // Current Neurovascular Research. 2017. V. 14. № 1. P. 71–81.
89. *Fisher D., Mentor S.* // Neural regeneration research. 2017. V. 12. № 5. P. 743–744.
90. *Rattner A., Williams J., Nathans J.* // J. Clin. Invest. 2019. V. 129. № 9. P. 3807–3820.
91. *Williamson J.R., Chang K., Frangos M., Hasan K.S., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard J.R., van den Enden M., Kilo C., Tilton R.G.* // Diabetes. 1993. V. 42. № 6. P. 801–813.
92. *Biron K.E., Dickstein D.L., Gopaul R., Jefferies W.A.* // PLoS One. 2011. V. 6. № 8. P. e23789.
93. *Успенская Ю., Моргунов А., Осипова Е., Пожиленкова Е., Салмина А.* // Успехи физиологических наук. 2021. Т. 52. № 2. С. 39–50.
94. *Matta R., Feng Y., Sansing L.H., Gonzalez A.L.* // Stem Cell Res. 2021. V. 53. P. 102318.
95. *Lin R., Cai J., Nathan C., Wei X., Schleidt S., Rosenwasser R., Iacovitti L.* // Neurobiol. Dis. 2015. V. 74. P. 229–239.
96. *Салмина А.Б., Инжутова А.И., Моргунов А.В., Окунева О.С., Малиновская Н.А., Лопатина О.Л., Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Кувачева Н.В.* // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 67. № 10. С. 29–37.
97. *Салмина А., Малиновская Н., Кувачева Н., Моргунов А., Хилажева Е., Горина Я., Пожиленкова Е., Фролова О.* // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 2. С. 122.
98. *Xie N., Zhang L., Gao W., Huang C., Huber P.E., Zhou X., Li C., Shen G., Zou B.* // Signal Transduction and Targeted Therapy. 2020. V. 5. № 1. P. 227.
99. *Hopp A.K., Grüter P., Hottiger M.O.* // Cells. 2019. V. 8. № 8. P. 890.
100. *Young G.S., Choleris E., Lund F.E., Kirkland J.B.* // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006. V. 346. № 1. P. 188–192.
101. *Lautrup S., Sinclair D.A., Mattson M.P., Fang E.F.* // Cell Metab. 2019. V. 30. № 4. P. 630–655.
102. *Grimaldi G., Corda D.* // Biochemical Society Transactions. 2019. V. 47. № 1. P. 357–370.
103. *Luengo A., Li Z., Gui D.Y., Sullivan L.B., Zagorulya M., Do B.T., Ferreira R., Naamati A., Ali A., Lewis C.A., Thomas C.J., Spranger S., Matheson N.J., Vander Heiden M.G.* // Mol. Cell. 2021. V. 81. № 4. P. 691–707.e6.
104. *Camacho-Pereira J., Tarragó M.G., Chini C.C.S., Nin V., Escande C., Warner G.M., Puranik A.S., Schoon R.A., Reid J.M., Galina A., Chini E.N.* // Cell Metab. 2016. V. 23. № 6. P. 1127–1139.
105. *van der Velden V., Rosenberg N., Maillard V., Teav T., Chatton J.-Y., Gallart-Ayala H., Ivanisevic J.* // Journal of Neurochemistry. 2021. V. 159. № 2. P. 378–388.
106. *Zeidler J.D., Hogan K.A., Agorrod G., Peclat T.R., Kashyap S., Kanamori K.S., Gomez L.S., Mazdeh D.Z., Warner G.M., Thompson K.L., Chini C.C.S., Chini E.N.* // American Journal of Physiology—Cell Physiology. 2022. V. 322. № 3. P. C521–C545.
107. *Aksoy P., White T.A., Thompson M., Chini E.N.* // Biochem Biophys Res Commun. 2006. V. 345. № 4. P. 1386–1392.
108. *Bruzzone S., Guida L., Zocchi E., Franco L., Flora A.D.* // The FASEB Journal. 2001. V. 15. № 1. P. 10–12.
109. *Dölle C., Rack J.G., Ziegler M.* // The FEBS Journal. 2013. V. 280. № 15. P. 3530–3541.
110. *Моргунов А.В., Кувачева Н.В., Хилажева Е.Д., Таранушенко Т.Е., Салмина А.Б.* // Бюллетень сибирской медицины. 2014. Т. 13. № 6. С. 5–9.
111. *Huang X., Guo H., Cheng X., Zhang J., Qu W., Ding Q., Sun Q., Shu Q., Li X.* // Cells. 2022. V. 11. № 8. P. 1283.
112. *Hattori T., Kaji M., Ishii H., Jureepon R., Takarada-Iemata M., Minh Ta H., Manh Le T., Konno A., Hirai H., Shiraishi Y., Ozaki N., Yamamoto Y., Okamoto H., Yokoyama S., Higashida H., Kitao Y., Hori O.* // Glia. 2017. V. 65. № 6. P. 974–989.
113. *Matyash M., Matyash V., Nolte C., Sorrentino V., Kettenmann H.* // FASEB J. 2002. V. 16. № 1. P. 84–86.
114. *Ceni C., Pochon N., Brun V., Muller-Steffner H., Andrieux A., Grunwald D., Schuber F., De Waard M., Lund F., Villaz M., Moutin M.J.* // Biochem J. 2003. V. 370. Pt 1. P. 175–83.
115. *Higashida H., Hashii M., Tanaka Y., Matsukawa S., Higuchi Y., Gabata R., Tsubomoto M., Seishima N., Teramachi M., Kamijima T., Hattori T., Hori O., Tsuji C., Cherepanov S.M., Shabalova A.A., Gerasimenko M., Minami K., Yokoyama S., Munesue S.I., Harashima A., Yamamoto Y., Salmina A.B., Lopatina O.* // Cells. 2019. V. 9. № 1. P. 62.
116. *Salmina A.B., Malinovskaya N.A., Okuneva O.S., Taranushenko T.E., Fursov A.A., Mikhutkina S.V., Morgun A.V., Prokopenko S.V., Zyкова L.D.* // Bull. Exp. Biol. Med. 2008. V. 146. № 6. P. 733–736.
117. *Salmina A.B., Okuneva O.S., Mikhutkina S.V., Malinovskaya N.A., Morgun A.V., Zyкова L.D., Yudin G.V., Laletin D.V., Fursov M.A., Frolova O.V., Tagaeva G.A., Bolshakova E.V.* // Bull. Exp. Biol. Med. 2011. V. 150. № 5. P. 583–586.
118. *Семёнова А.А., Горина Я.В., Хилажева Е.Д., Харитоновна Е.В., Салмина А.Б.* // Сибирский научный медицинский журнал. 2021. Т. 41. № 5. С. 37–46.
119. *Малиновская Н.А., Салмина А.Б., Прокопенко С.В., Комлева Ю.К., Морозова Г.А., Панина Ю.А., Кызы Г.Э.Д.* // Сибирское медицинское обозрение. 2014. № 6 (90). С. 20–25.
120. *Хилажева Е., Мосягина А., Моргунов А., Малиновская Н., Горина Я., Харитоновна Е., Лопатина О., Салмина А.* // Цитология. 2021. Т. 63. № 6. С. 548–556.
121. *Салмина А., Окунева О., Таранушенко Т., Фурсов А., Прокопенко С., Мухуткина С., Малиновская Н., Тагаева Г.* // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2008. Т. 2. № 3. С. 44–51.
122. *Xiao W., Loscalzo J.* // Antioxid. Redox Signal. 2020. V. 32. № 18. P. 1330–1347.
123. *Braid N., Poljak A., Grant R., Jayasena T., Mansour H., Chan-Ling T., Guillemin G.J., Smythe G., Sachdev P.* // Biogerontology. 2014. V. 15. № 2. P. 177–198.
124. *Gerasimenko M., Cherepanov S.M., Furuhashi K., Lopatina O., Salmina A.B., Shabalova A.A., Tsuji C., Yokoyama S., Ishihara K., Brenner C., Higashida H.* // Scientific Reports. 2020. V. 10. № 1. P. 10035.
125. *Subburaju S., Kaye S., Choi Y.K., Baruah J., Datta D., Ren J., Kumar A.S., Szabo G., Fukumura D., Jain R.K., Elkhali A., Vasudevan A.* // Sci Adv. 2020. V. 6. № 41. P. eabb9766.

126. Roboon J., Hattori T., Ishii H., Takarada-Iemata M., Nguyen D.T., Heer C.D., O'Meally D., Brenner C., Yamamoto Y., Okamoto H., Higashida H., Hori O. // *Journal of Neurochemistry*. 2021. V. 158. № 2. P. 311–327.
127. Zhao Y., Zhang J., Zheng Y., Zhang Y., Zhang X.J., Wang H., Du Y., Guan J., Wang X., Fu J. // *Journal of Neuroinflammation*. 2021. V. 18. № 1. P. 207.
128. Hou Y., Lautrup S., Cordonnier S., Wang Y., Croteau D.L., Zavala E., Zhang Y., Moritoh K., O'Connell J.F., Baptiste B.A., Stevnsner T.V., Mattson M.P., Bohr V.A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. V. 115. № 8. P. E1876–E1885.
129. Vreones M., Mustapic M., Moaddel R., Pucha K.A., Lovett J., Seals D.R., Kapogiannis D., Martens C.R. // *Aging Cell*. 2023. V. 22. № 1. P. e13754.
130. Campbell J.M. // *Nutrients*. 2022. V. 14. № 15. P. 3231.
131. Norat P., Soldozy S., Sokolowski J.D., Gorick C.M., Kumar J.S., Chae Y., Yağmurlu K., Prada F., Walker M., Levitt M.R. // *NPJ Regenerative Medicine*. 2020. V. 5. № 1. P. 22.
132. Meyer T., Shimon D., Youssef S., Yankovitz G., Tessler A., Chernobylsky T., Gaoni-Yogev A., Perelroizen R., Budick-Harmelin N., Steinman L., Mayo L. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. V. 119. № 35. P. e2211310119.
133. Hayakawa K., Esposito E., Wang X., Terasaki Y., Liu Y., Xing C., Ji X., Lo E.H. // *Nature*. 2016. V. 535. № 7613. P. 551–555.
134. Горина Я., Харитоновна Е., Потапенко И., Салмина А. // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2020. Т. 56. № 7. С. 567.
135. Salmina A.B., Kharitonova E.V., Gorina Y.V., Teplyashina E.A., Malinovskaya N.A., Khilazheva E.D., Mosyagina A.I., Morgun A.V., Shuvaev A.N., Salmin V.V., Lopatina O.L., Komleva Y.K. // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 9. P. 4661.

Metabolic Plasticity of a Developing and Aging Brain

A. B. Salmina^{a, b}

^a Research Center of Neurology, Moscow, Russia

^b V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Brain plasticity is a fundamental phenomenon based on various types of intercellular interactions (synaptic activity, neuritogenesis, synaptogenesis and elimination of synapses, neuron-glia interactions), development, differentiation, migration of newly-born cells and cell death (neurogenesis/gliogenesis and neuronal or glial cell death, angiogenesis and regression of cerebral microvessels), adaptation of tissue metabolism to changing environmental conditions. In this review, we discuss our own data and available literature in the context of regulation of certain types of energy metabolism (glycolysis, mitochondrial respiration) in neuronal, glial, and endothelial cells, the signaling functions of metabolites in nervous tissue, the mechanisms of establishment of cerebral insulin resistance, pseudohypoxia and associated neuroinflammation in brain pathology, as well as some prospects for detecting novel molecular markers of pathobiochemical processes associated with impaired metabolic plasticity in the developing and aging brain.

Keywords: brain, metabolism, energy production, brain development, brain aging, neurodegeneration, pseudohypoxia

МАРКЕРЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2023 г. М. А. Никитина¹ *, В. М. Алифиров¹, С. О. Бородина¹, Е. С. Королёва¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, кафедра неврологии и нейрохирургии, Томск, Россия

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 01.03.2023 г.

Принята к публикации 03.03.2023 г.

Данная обзорная статья посвящена описанию роли биомаркеров периферической крови, участвующих в нейродегенерации и нейрорегенерации при болезни Паркинсона: BDNF, Катепсин D, NSAM, миелопероксидаза, ингибитор активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации (RANTES) и молекулы межклеточной адгезии (sICAM-1). Представляемые биомаркеры, являющиеся важными индикаторами биологических процессов, перспективно рассматривать в отношении ранней диагностики, прогнозирования течения заболевания и разработки новых возможностей болезнью-модифицирующей терапии болезни Паркинсона, так как они связаны с нейропротективными и нейротрофическими системами.

Ключевые слова: нейродегенерация, болезнь Паркинсона, нейротрофический фактор головного мозга, BDNF, миелопероксидаза, Катепсин D, NSAM, PAI-1, PDGF, RANTES, ICAM-1

DOI: 10.31857/S1027813323030135, EDN: YVBIUQ

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) — это нейродегенеративное заболевание, уступающее по распространенности только болезни Альцгеймера (БА) [1, 2]. Рост заболеваемости связан с увеличением продолжительности жизни и общим старением населения [3]. БП относится к мультисистемной α -синуклеинопатии, приводящей к гибели дофаминергических нейронов среднего мозга. Помимо пожилого возраста, который является общеизвестным фактором риска заболевания, дегенерации дофаминергических нейронов также способствуют факторы окружающей среды и генетические дефекты [4]. Стоит отметить, что органические химические вещества и пестициды, такие как 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР) и ротенон, помимо непосредственного повреждения дофаминергических нейронов, наносят долгосрочный ущерб нейронам центральной нервной системы (ЦНС), влияя на метилирование ДНК и способствуя развитию воспалительных реакций в паренхиме головного мозга [5, 6]. Основываясь на вышеупомянутых данных о факторах окружающей среды и воспалении, научные исследования были сосредоточены на изучении возможной роли медиаторов воспаления в патофизиологии и прогрессировании БП.

Полученные к настоящему времени знания о патофизиологии БП ограничены и достаточно противоречивы. После анализа данных исследований, проведенных в области нейродегенеративных заболеваний, нейробиологи обнаружили связь между дегенерацией головного мозга и устойчивым воспалением [7, 8]. Что касается БП, прогрессирующая дегенерация дофаминергических нейронов была идентифицирована в компактной части черной субстанции наряду с включениями агрегатов α -синуклеина, также известного как тельца Леви [9, 10]. Дальнейшие исследования установили наличие этих включений в периферической нервной системе, что способствовало выводам о том, что патологический процесс начинается на периферии, а затем распространяется на ЦНС, в соответствии с системой стадирования Heiko Braak [11]. В исследованиях БП на крысиных моделях воспалительный процесс был идентифицирован в виде активированной микроглии, продуцирующей цитокины, увеличения аутореактивных Т-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток с МНС II комплексами в периферической и центральной нервной системе [12]. Возможно, механизмы молекулярной мимикрии связывают дегенерацию дофаминовых нейронов и различные вирусные инфекции [13]. Более того, скопления α -синуклеина, обнаруженные в головном мозге и кишечнике, по-видимому, устанавливают определенную связь между этими двумя, казалось бы, не связанными между собой ор-

* Адресат для корреспонденции: 634050, Томск, Московский тракт, 2, e-mail: nikitina_ma@mail.ru.

Таблица 1. Классификация биомаркеров

Виды биомаркеров	Характеристика
Биомаркеры восприимчивости/риска	Отражают потенциальный риск заболевания
Диагностические биомаркеры	Используются с целью ранней и точной диагностики, для подтверждения наличия заболевания
Прогностические биомаркеры	Предсказывают течение и темп прогрессирования заболевания. Такие биомаркеры могут быть одновременно и предиктивными
Предиктивные (предсказывающие) биомаркеры	Определяют ответ на терапию и/или токсичность лекарственных препаратов. Они дают информацию о том, какие пациенты могут или, наоборот, маловероятно получить пользу от конкретного лечения

ганами, а воспаление в кишечнике функционирует как возможная отправная точка для нейродегенерации в компактном веществе черной субстанции [14].

Согласно определению, предложенному рабочей группой по биомаркерам, FDA-NIH [15], биомаркеры – это характеристики, которые объективно измеряются и оцениваются как индикаторы нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологического ответа на терапевтическое вмешательство.

Несмотря на то, что не существует единой общепринятой классификации биомаркеров, наиболее удачной является их группировка с точки зрения роли в персонализированной медицине [16, 17] (табл. 1).

Так, в качестве прогностических маркеров, определяющих особенности клинического течения БП и ответа на противопаркинсоническую терапию, может быть использован мозговой нейротрофический фактор (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), белок отвечающий за развитие, регенерацию, сохранение и поддержание нейронов, участвует в дифференцировке нейронов, созревании, выживании и формировании синапсов [18]. Во взрослом организме основная функция BDNF – нейротрофическая [19].

Другие потенциальные нейромаркеры включают хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации (RANTES), коррелирующий с двигательными функциями у пациентов с БП [20], катепсин D (протеаза, активность которой, как было установлено, связана с гибелью клеток при моделировании БП на приматах) [21]; миелопероксидаза (МПО), фермент с нейротоксическими эффектами, изучавшимися в экспериментальной модели БП на грызунах [22]; молекула адгезии нервных клеток (NCAM) как потенциальный нейротрофический медиатор [23]; тромбоцитарный фактор роста АВ (PDGF-AB/BB), регенеративные свойства которого были продемонстрированы на крысиной модели БП [24].

Цель данной обзорной статьи – описать роль биомаркеров периферической крови, участвующих

в процессах нейродегенерации и нейрорегенерации при болезни Паркинсона.

МОЗГОВОЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР (BDNF)

Между BDNF и дофаминергической системой существует тесная связь. Данный белок обладает протективным эффектом в отношении дофаминергических нейронов и способствует их выживаемости. Дофамин, в свою очередь, способен индуцировать транскрипцию гена BDNF. Вероятно, что при формировании позитивных симптомов шизофрении наблюдается повышенный синтез BDNF за счет активации дофаминергической системы. Также, возможно, сам BDNF может усиливать позитивные симптомы, обеспечивая выживаемость дофаминергических нейронов [18].

Нейротрофины синтезируются в основном в ЦНС, а также в ненейрональных периферических клетках, таких как Т- и В-лимфоциты, моноциты [25], эндотелиальные клетки сосудов [26], клетки гладких и скелетных мышц [27]. Установлено, что экспрессия BDNF осуществляется в гиппокампе, лобной коре, среднем мозге, миндалевидном теле, гипоталамусе, стриатуме, мосту и продолговатом мозге [28]. BDNF играет ключевую роль в развитии нервной системы, влияя на дифференцировку клеток, развитие нейронов, нейрогенез, синаптогенез и синаптическую пластичность [29–31]. Кроме того, было показано, что нейродегенеративные и психоневрологические расстройства могут быть частично обусловлены дефектами синаптической пластичности, связанными с недостаточным обеспечением нейронов BDNF и другими нейротрофическими факторами [32, 33]. Вследствие этого, возникает необходимость поиска новых методов повышения уровня BDNF, как средства профилактики и терапии неврологических заболеваний.

Изменения в регуляции специфических нейротрофических факторов и их рецепторов связаны с развитием нейродегенеративных заболеваний. Нейротрофины предотвращают гибель клеток и поддерживают пролиферацию и созревание нейронов, усиливая рост и функционирование пора-

женных нервных клеток при БП и БА [19, 34]. В современных методах лечения БП и БА, целью которых является прекращение прогрессирования нейродегенерации, вопрос о применении нейротрофических факторов на ранних, умеренных и даже поздних стадиях этих заболеваний остается одним из наиболее актуальных. Несмотря на то, что исследования на животных моделях многообещающие, их эффективность в клинических исследованиях остается спорной [35, 36].

Активируя киназный путь IP3K/Akt, нейротрофины ингибируют процессы, вызывающие гибель клеток [37–39]. Напротив, снижение экспрессии нейротрофинов, особенно BDNF, наблюдаемое в процессе старения и при нейродегенеративных заболеваниях, способствует прогрессированию нейродегенеративного процесса и гибели нейронов [40]. Снижение уровня BDNF в сыворотке крови и головном мозге наблюдается у индивидуумов с депрессией, у пациентов с БА и БП [19, 40–43]. У последних гибель дофаминергических нейронов, обуславливает двигательные нарушения, когнитивный дефицит и психические расстройства [44–48], коррелирует с нарушением памяти и способностью к обучению [32, 49–51]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что снижение уровня BDNF при БП может способствовать гиперэкспрессии α -синуклеина и ингибированию синтеза дофамина [52–54]. Более того, сообщается, что гиперэкспрессия α -синуклеина при БП подавляет продукцию нейротрофинов (BDNF и NGF — nerve growth factor, фактор роста нервов) в черной субстанции головного мозга [55]. BDNF участвует в регуляции тирозингидроксилазы, которая также снижается при БП, что приводит к двигательным расстройствам [19, 56]. Сайленсинг (репрессия, замалчивание) гена, кодирующего BDNF, у мышей приводит к потере дофаминергических нейронов, что подтверждает его роль в защите нервных клеток от повреждения и нейропротекции [57, 58]. Существуют исследования, показывающие, что нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF) также может предотвращать дегенерацию дофаминергических нейронов при БП [59, 60].

Нейропротекторный эффект BDNF является результатом активации пути TrkB/MAPK/ERK1/2/IP-3K/Akt, что приводит к ослаблению нейротоксичности глутамата, оксида азота (NO) и уменьшению повреждения клеток, вызванного окислительным стрессом [61]. Напротив, при БП наблюдается усиление окислительного стресса, глутаматной нейротоксичности, продукции NO и процесса апоптоза [62–64].

Следует отметить, что объем данных, указывающих на связь между снижением уровня BDNF и прогрессированием БП, неуклонно растет [19, 56, 58, 65–67].

МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА

Миелопероксидаза (МПО) представляет собой лизосомальный фермент, состоящий из двух тяжелых и двух легких субъединиц, являющийся основным компонентом полиморфноядерных лейкоцитов (нейтрофилов), который был также обнаружен в лизосомах моноцитов [68].

МПО является компонентом арсенала врожденной иммунной системы, присутствующим в везикулах фагоцитов. При фагоцитозе нейтрофилами и моноцитами чужеродных микроорганизмов, везикулы, содержащие МПО, сливаются с фагосомой, высвобождая фермент, который реагирует в присутствии перекиси водорода (H_2O_2) с ионами хлорида (Cl^-) с образованием сильнодействующего окислителя, хлорноватистой кислоты (HOCl), что лежит в основе действия отбеливателей [69–71].

Несмотря на то, что окислители, производимые МПО, обладают бактерицидным действием и, следовательно, играют положительную роль, эти вещества также могут повреждать здоровые клетки. Ген МПО считается миелоид-специфичным, так как он экспрессируется миелоидными клетками-предшественниками костного мозга, но при БП и БА его экспрессия была обнаружена в астроцитах, клетках микроглии и нейронах [68, 72–76].

МПО играет важную роль не только в защите от микроорганизмов, но и в патогенезе сердечной дисфункции, атеросклероза, заболеваний дыхательных путей и ЦНС [77–79]. Так при БП и болезни Гентингтона достоверно более высокие уровни МПО выявлены в образцах среднего мозга и в образцах хвостатого ядра соответственно, тогда как при боковом амиотрофическом склерозе в образцах моторной коры отличий данного фермента не выявлено по сравнению с группой контроля [22]. Более того, результаты анализа тканей головного мозга на мышиной модели БП hMPO-A53T показали, что экспрессия МПО происходит в нейронах компактной части черной субстанции. Установлено, МПО способствует нитрации и карбамилрованию α -синуклеина, что приводит к повышенной его агрегации, а клинически — к более выраженным двигательным нарушениям БП и более раннему дебюту моторных проявлений. Кроме того, нейрональная экспрессия МПО была описана при БА в зернистых и пирамидных нейронах гиппокампа. Также при рекуррентном депрессивном расстройстве была продемонстрирована корреляция между повышенным уровнем МПО в сыворотке крови и снижением когнитивных функций [80, 81].

МПО экспрессируется как форма предшественника проМПО, которая секретируется, потенциально распространяя окислительное повреждение на соседние нейроны. Представленные данные свидетельствуют о том, что МПО может быть хорошей мишенью для разработки терапевтических средств, блокирующих его активность.

Это может привести к снижению окисления и агрегации α -синуклеина, вследствие чего к уменьшению тяжести БП. Недавно была завершена I фаза исследования с использованием ингибитора МПО для лечения БП [72, 82]. Кроме того, исследования на животных моделях рассеянного склероза [83] и мультисистемной атрофии [84, 85] показывают положительные эффекты блокирования активности МПО.

С другой стороны, была описана новая форма акинетико-ригидного синдрома — паркинсонизм у пациентов с дефицитом МПО фагоцитов [86]. Согласно данным исследования, установлен характерный фенотип нейродегенеративного заболевания: молодой возраст дебюта двигательных проявлений паркинсонизма, женский пол, отрицательный семейный анамнез по БП, но положительный по дефициту МПО, превалирование в клинической картине акинетико-ригидного синдрома (признак вторичного паркинсонизма), удовлетворительная чувствительность к специфическим противопаркинсоническим препаратам.

КАТЕПСИН D

Катепсин D (CTSD) является аспарагиновой протеазой, присутствующей в лизосомах всех клеток организма человека [87]. В головном мозге фермент экспрессируется преимущественно в дофаминергических нейронах коры, гиппокампа, полосатого тела и черной субстанции [88]. Изначально фермент синтезируется как про-CTSD в комплексе Гольджи и транспортируется в эндосомы, где впоследствии теряет свой ингибирующий про-пептид, превращаясь в активную форму одноцепочечного катепсина D [89]. В результате трансформации в лизосомах, фермент приобретает свою конечную структуру, состоящую из одной легкой цепи (14 кДа) и одной тяжелой цепи (31–33 кДа), соединенных друг с другом нековалентными связями [90].

Катепсин D играет значительную роль в поддержании белкового гомеостаза нейронов [91], участвует в протеолизе таких патологических белков, как α -синуклеин, β -амилоид и гентингин, являющихся индукторами нейродегенеративных процессов [90]. Существует 11 вариантов мутаций катепсина D, выявленных у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями: A58V, S100F, G149V, F229I, Y255X, W383C, R399H, V95I, G145V, A239V и R266H, четыре из которых связаны с БП (V95I, G145V, A239V, R266H). Однако, при исследовании воздействия данных мутаций на экспрессию и функционирование фермента было доказано, что они не влияют на его трансформацию, транспортировку в лизосомы и активность. Более того, вариант A239V показал усиленный протеолиз α -синуклеина [92]. В данном случае парадоксальное накопление α -синуклеина может

быть объяснено тем, что в процессе белкового гидролиза катепсин D создает множество укороченных на C-конце фибрилл, служащих субстратом для агрегации α -синуклеина [93]. Из-за структурных ограничений протеасом, данные белковые макроагрегаты удаляются исключительно путем макроаутофагии и шаперон-зависимой аутофагии. Однако, при избыточной белковой агрегации, типичной для БП, их возможности резко сокращаются, что приводит к накоплению α -синуклеина в клетках [90].

При гаплонедостаточности катепсина D у пациентов с БП наблюдалась дисфункция лизосом, способствующая межклеточной передаче агрегатов α -синуклеина и приводящая к гибели дофаминергических нейронов [94]. Внутриклеточное введение нейротоксина ротенона также способствовало лизосомальной дисфункции, вызывая пермеабиллизацию данных органелл и переход катепсина D в цитоплазму, что является триггером клеточного апоптоза [90]. Как показали исследования, несмотря на то, что не все нейронные лизосомы содержат данную эндопептидазу, катепсин D является более значимым маркером лизосомальной дисфункции, чем LAMP-1 [95] или катепсин-B и L [96], так как их выключение не вызывало столь значительных внутриклеточных изменений.

Глобальный анализ протеомики тканей головного мозга при транзиторной мозговой ишемии у крыс показал, что экспрессия катепсина D снижает степень белковой агрегации при инсульте [97], улучшая клиренс разрушенных белков [98]. При исследовании роли катепсина D в развитии инсульта на модели мышей с кислородно-глюкозной депривацией посредством окклюзии средней мозговой артерии было выявлено, что альтернативные изменения в его структуре являются начальным звеном патогенеза инсульта, приводящим к агрегации белков, оксидативному стрессу и клеточной гибели, аналогично процессам нейродегенерации при БП. Уровни про-CTSD и катепсина D значительно снижались в первый час эксперимента, что объясняется распадом обеих форм и недостаточным транспортом прокатепсина к лизосомам. Помимо белковой деградации, протеолитическая активность самого фермента также постепенно снижалась в данной модели [99].

Исходя из изложенного, фермент-заместительная терапия является перспективным направлением патогенетического лечения БП. Так, в экспериментальном исследовании 2022 года при воздействии на H4-нейроглиомные клетки рекомбинантным активированным проферментом gHsCTSD отмечалось увеличение сигнала от внутриклеточного катепсина D, а также снижение концентрации нерастворимых агрегатов α -синуклеина, в то время как уровень Triton-растворимого синуклеина оставался прежним. Следует также от-

метить, что исследуемые нейрональные клетки сохраняли спонтанную активность и способность к генерации импульсов, следовательно, введенный профермент не влияет на их электрофизиологическую характеристику [100].

ИНГИБИТОРЫ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА ПЕРВОГО ТИПА (PAI-1)

В норме тканевый активатор плазминогена (tPA) активирует плазминоген, превращая его в активный плазмин [101]. Недавние исследования показали, что плазмин способен расщеплять α -синуклеин, предотвращая его агрегацию и образование токсических телец Леви, чтобы уменьшить гибель нейронов [102]. Напротив, воспалительные цитокины увеличивают синтез ингибитора активатора плазминогена первого типа (PAI-1), главного природного протеазного ингибитора фибринолиза [103], и это снижает как выработку плазмينا, так и последующий плазмин-опосредованный протеолиз α -синуклеина, поддерживая его дальнейшую агрегацию. Данная гипотеза, ориентированная на БП, имеет потенциал для стратегий лечения, направленных на расщепление агрегатов α -синуклеина в головном мозге. Так, регуляция tPA и uPA/uPAR в первую очередь осуществляется классом белков, называемых серпинами [104–106]. Именно профессор Patrik Brundin предложил, что для развития БП необходимо наличие трех составляющих: (I) триггеров, запускающих болезнь; (II) фасилитаторов, помогающих триггерам вызвать заболевание; и (III) промоторов, которые способствуют прогрессированию заболевания [107].

ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ФАКТОР РОСТА

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF, platelet-derived growth factor) является димерным гликопротеином, состоящим из двух субъединиц, соединенных дисульфидной связью. Существует четыре вида гомодимеров данного фермента – PDGF-A, -B, -C, -D, и один гетеродимер – AB. Все факторы роста, кроме PDGF-CC, синтезируются в виде проферментов и активируются путем частичного протеолиза при секреции [108]. При связывании PDGF-лиганда с PDGF- α -рецептором, происходит его димеризация, индуцирующая аутофосфорилирование внутриклеточных киназ с последующей активацией сигнальных молекул [109]. Существует две рецепторные тирозинкиназы, способные образовывать гомо- и гетеродимерные рецепторные комплексы, PDGFR- α и - β . PDGFR- $\alpha\alpha$ активируется PDGF-AA, -AB, -CC и -BB, PDGFR- $\alpha\beta$ активируется PDGF-AB, -BB и -CC, и PDGFR- $\beta\beta$ активируется PDGF-BB и -DD. Все лиганды и рецепторы PDGF были обнаружены в ЦНС млекопитающих [110].

PDGF играет важную роль, начиная с периода гастрюляции до поддержания гомеостаза зрелых нейронов, способствуя развитию как преплакодных предшественников, плакодной эктодермы, и клеток нервного гребня, так и взрослых нейральных предшественников в сочетании с другими факторами. При травмах или различных стрессах, PDGF повышает возбудимость нейронов, воздействуя на ионные каналы и синаптическую пластичность. Кроме того, PDGF обладает антиапоптотической способностью, главным образом посредством сигнального пути PI3-K/Akt. Исследования предполагают участие PDGF в формировании дендритных шипиков, что имеет решающее значение для развития памяти [111]. PDGF-AB необходим для роста и миграции мезенхимальных клеток [112], его экспрессия увеличивается в заживающей ране или при хронических воспалительных заболеваниях [113].

Существует подгруппа клеток в субвентрикулярной зоне, с рецепторами тромбоцитарноподобного фактора роста типа α (PDGFR α + клетки) [114]. Данные глиальные предшественники мигрируют из субвентрикулярной зоны латерально к стриатуму и дорсально к белому веществу и неокортикальному серому веществу, где дают начало астроцитам и олигодендроцитам [115]. В некоторых исследованиях упоминаются другие мультипотентные клетки в передних отделах головного мозга, имеющие PDGF- α рецептор, которые являются предшественниками не только олигодендроцитов, астроцитов, но и нейронов [116]. Впоследствии было установлено, что PDGFR α + клетки дифференцируются в пирамидные глутаматергические нейроны грушевидной коры, полигональные астроциты A2B5-/GD3-/GFAP+, радиальную глию A2B5-/GD3+/GFAP+, незрелые нейроны TuJ1+ и олигодендроциты O4+ [117]. Однако данные исследования показали, что PDGFR α + клетки способны давать начало нейронам только в неокортексе новорожденных до 12-го дня постнатального развития, во взрослом же возрасте дифференцировка осуществляется только по глиальной линии [118].

При проведении оценки уровня 160 иммунных маркеров в плазме крови пациентов с БП и деменцией, было выявлено, что уровни PDGF-AA и PDGF-BB имеют более высокий коэффициент корреляции с уровнем α -синуклеина, чем другие маркеры, 0.460 и 0.535 соответственно [119].

Воздействуя на NR2B-содержащие NMDA-рецепторы в нейронах гиппокампа *in vitro*, PDGF-BB ингибирует возбуждающие постсинаптические потенциалы, что говорит об антиэксцитотоксическом эффекте фермента [120]. Помимо прямого действия, он также индуцирует экспрессию генов выживания, включая GSK3 β и фосфатидилинозитол-3-киназа K (PI3K)/Akt [121]. Также было выявлено, что PDGF-BB более эффективно пре-

пятствует возникновению оксидативного стресса, чем PDGF-AA, активируя антиоксидантные ферменты [122]. Помимо нейронов, подвергшихся ишемии, нейропротекторная роль PDGF описана для дофаминергических нейронов [121, 123].

ХЕМОКИН, ЭКСПРЕССИРУЕМЫЙ И СЕКРЕТИРУЕМЫЙ Т-КЛЕТКАМИ ПРИ АКТИВАЦИИ (RANTES)

Хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации (RANTES) по своей структуре представляет полипептид, состоящий из 68 аминокислот, и обладает провоспалительной активностью. RANTES инициирует миграцию Т-лимфоцитов и моноцитов в очаг воспаления, связываясь со специфическими рецепторами, сопряженными с G-белком (GPCR), а именно — CCR1, CCR3, CCR4 и CCR5 [124]. При измерении концентрации различных цитокинов в сыворотке крови пациентов с БП было выявлено, что уровень RANTES и 6 других биомаркеров был значительно выше по сравнению с контрольной группой (Hedges g , 0.605; 95% CI, 0.111–1.099; $p = 0.02$), что свидетельствует об участии хемокина в формировании воспалительной реакции и патогенезе БП [125]. Также была подтверждена корреляция между тяжестью БП и уровнем RANTES в сыворотке, так как его концентрация ступенчато возрастала в зависимости от стадии по шкале Хен и Яра и длительности болезни. Таким образом, RANTES может служить суррогатным биомаркером для оценки тяжести БП, выступая в качестве меры для оценки эффективности фармакологического вмешательства [126].

В 2016 г. было высказано предположение о возможном влиянии хемокинов на предрасположенность к возникновению БП в зависимости от их экспрессии и функциональной активности. В результате исследования образцов ДНК пациентов с БП и контрольной группы полиморфизм RANTES (–28C>G) был выявлен у 12.5% больных БП. Было установлено, что С-аллель обладает нейропротективным эффектом, в то время как G-аллель ассоциирован с развитием нейродегенеративного заболевания [127].

При исследовании взаимосвязи однонуклеотидных полиморфизмов RANTES с риском возникновения спорадической БП в индийской популяции было выявлено существенное различие в частоте встречаемости гетерозиготного CG-генотипа для RANTES (–28 C>G), в то время как в контрольной группе преобладал GC+CC-генотип. Более того, сочетание аллелей G-A-G-C для RANTES (–403 A/G) и RANTES (–28 C/G) было ассоциировано с риском возникновения БП ($OR = 6.18$, $p = 0.005$) [128].

Установлено, что повышение RANTES вызывает хроническую инфильтрацию CD4+ и CD8+-лимфоцитами, играющую важную роль в развитии дисфункции nigrostriарной системы, что было подтверждено в модели БП у крыс, индуцированной введением MPTP [129]. В аналогичном исследовании было определено влияние RANTES на повышенную миграцию в черную субстанцию субпопуляции CD4+-лимфоцитов — Т-хелперов-17. Инвазия лимфоцитов данного типа вызывала наибольшую гибель дофаминергических нейронов, по сравнению с эффектом от инвазии Т-хелперов 1 типа или регуляторных Т-лимфоцитов, чья миграция не индуцируется RANTES [130, 131]. Тем не менее, в опыте на обезьянах с гемипаркинсонизмом при введении пептида NEMO-связывающего домена, блокирующего NF-κB-сигнальный путь, было выявлено снижение воспалительной инфильтрации черной субстанции за счет CD8+-лимфоцитов, а также уровня экспрессии RANTES [132], так как данный путь ассоциирован с промоторным участком гена RANTES [133].

При исследовании эффекта блокирующих анти-тел было выявлено, что нейтрализация RANTES значительно снижала лимфоцитарную инфильтрацию, экспрессию индуцируемой NO-синтазы, глияльного фибриллярного кислого протеина (GFAP), интегрин альфа-М (CD11b), IL-1β в черной субстанции, что подтверждается уменьшением доли погибших нейронов (22%, в отличие от 65% в контрольной группе). Данные результаты свидетельствуют о значительной роли хемокина в процессах микроглияльной активации и формировании вторичного воспаления [134]. Также было обнаружено, что фенольные смолы пальмового масла способствуют снижению экспрессии RANTES и других хемокинов, секретируемых реактивными астроцитами в ответ на стимуляцию IL-1β, оказывая нейропротективное действие. Более того, эффект был дозо- и время-зависимым: спустя 96 ч экспозиции уровень RANTES снижался на 65% при концентрации 10 мкл/мл, в то время как при концентрации 20 мкл/мл — от 64 до 82% [135].

МОЛЕКУЛЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ

Растворимая форма молекулы межклеточной адгезии 1-го типа (sICAM-1, intercellular adhesion molecule) является иммуноглобулиноподобной молекулой клеточной адгезии, присутствующей на мембранах эндотелиальных клеток и связывающаяся с интегрином αLβ2 — LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), экспрессируемым на поверхности Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов, который участвует в рекрутировании этих клеток к очагу нейронального воспаления. В ЦНС ICAM-1 экспрессируется астроцитами [136]. Экспериментальным способом было доказано усиление активности ICAM-1 эндотелиальных

клеток при воздействии провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β . Также была обнаружена новая функция белковой молекулы — регуляция ферментов, участвующих в метаболизме амилоида. Результаты генетического анализа показали, что усиление экспрессии ICAM-1 возникает в результате выключения гена KDM7A, приводящего к возможному преобладанию влияния TFEB на лизосомальные функции путем увеличения активности лизосомальных белков [137].

В эксперименте на крысах с индуцированной БП было выявлено, что количество CD4-иммунокомпетентных клеток увеличивалось в поврежденной черной субстанции. Эти клетки также экспрессировали специфический фактор транскрипции Т-хелперов-17 ROR γ t, способствующий их миграции и накоплению в данной области. В описываемом исследовании было установлено, что добавление культуры Т-хелперов-17 к культуре вентральных мезэнцефальных нейронов уменьшало количество TH+NeuN+, тирозингидроксилаза-позитивных, и TH–NeuN+ нейронов [138]. Проведенный в 2018 году анализ базы данных Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG), содержащей информацию о генных продуктах, связанных в сети белок-белковых взаимодействий, показал высокую степень значимости ICAM-1 в развитии БП [139].

Результаты проточной цитометрии показали, что эндотелиальные клетки, определяемые как клетки CD45-CD31+, мозга мышей, на 4-й день после инъекции МРТР экспрессировали более высокий уровень ICAM-1 по сравнению с клетками мышей, получавших физиологический раствор. Более того, блокирование LFA-1 и ICAM-1 специфическими антителами уменьшало выраженность моторных проявлений БП, способствовало увеличению TH+–клеток [140].

На той же модели БП был установлен факт непосредственного взаимодействия между LFA-1 рецепторов Т-хелперов-17 и ICAM-1 рецепторов дофаминергических нейронов, что говорит о прямом цитотоксическом влиянии лимфоцитов на вентральные мезэнцефальные нейроны. Данное взаимодействие активирует JNK-сигнальный путь с последующим увеличением экспрессии двух AP-1 сигнальных молекул c-Jun и c-Fos, индуцирующих процессы клеточного апоптоза. Т-хелперы-17 также вызывают активацию матриксной металлопротеиназы-9 и каспазы-3, двух ключевых протеолитических ферментов, участвующих в запрограммированной гибели клеток [138].

В исследовании влияния периферического воспаления на очаг нейродегенерации в nigro-стриарной системе, вызванный интранигральной инъекцией липополисахарида, ОТ-ПЦР анализ показал индукцию экспрессии мРНК ICAM-1 в течение 6 ч после инъекции [141]. В более ранних исследованиях биоптата пациентов с БП была

выявлена лейкоцитарная инфильтрация черной субстанции в 5 раз превышающая показатели контрольной группы ($P < 0.001$), при иммуногистохимическом анализе данных образцов на 5 различных антител к ICAM-1 реактивные астроциты показали интенсивное окрашивание по сравнению с астроглией непораженных участков, что свидетельствует о высокой экспрессии ICAM-1 в данной области и его роли в поддержании иммунного воспаления [136].

Мультиплексный иммуноанализ уровня ICAM-1 в спинномозговой жидкости и сыворотке крови больных БП показал выраженную положительную корреляцию между концентрацией ICAM-1 и БП-специфическими биомаркерами в ликворе (t-Tau, p181-Tau и α -синуклеин) у пациентов обоих полов, в то время как аналогичная корреляция в сыворотке была выражена только у женщин и только в отношении t-Tau, p181-Tau. На основании полученных результатов было высказано предположение о возможной независимой регуляции уровня воспаления в ЦНС и периферической крови. Исходя из этого, измерение данного биомаркера в ликворе является наиболее достоверно отражающим патологию ЦНС: значимая корреляция воспалительных маркеров между цереброспинальной жидкостью и сывороткой была обнаружена только в 25% случаев (у 9 из 36 пациентов) среди мужчин и у 38% женщин с БП. Дополнительно при анализе взаимосвязи с возрастом было выявлено, что более высокий уровень ICAM-1 ассоциирован с более пожилым возрастом [142].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания представляют собой состояния, характеризующиеся дегенеративными изменениями структур нервной системы. Поскольку нейроны сложно поддаются регенерации, их кумулятивное повреждение может привести к таким возраст-зависимым заболеваниям, как БП, болезнь Альцгеймера и другим. Несмотря на многолетние фундаментальные исследования, в настоящее время патогенез данных заболеваний до конца неизвестен. На сегодняшний день установлено, что сочетание генетических мутаций, иммунологической дисфункции, окислительного стресса, митохондриальной дисфункции, нейровоспаления и агрегации внеклеточного α -синуклеина вносят существенный вклад в развитие БП [143–146].

Учитывая свойства BDNF, наличие связи между его снижением и прогрессированием БП, отсутствие лекарств, излечивающих от БП, в настоящее время продолжается поиск эффективных терапевтических средств для лечения нейродегенеративных заболеваний, и применение BDNF представляется весьма перспективным направлением

в оптимизации лечения и реабилитации данной категории больных.

Было проведено несколько исследований, установивших безопасность и терапевтическую эффективность ингибитора миелопероксидазы, что также может оказывать благотворное влияние на лечение нейродегенеративных заболеваний, в патогенезе которых важную роль играет окислительный стресс, индуцированный ее экспрессией.

Также установлено, что фермент-заместительная терапия (при воздействии на H4-нейроглиомные клетки рекомбинантным активированным проферментом rHsCTSD) является перспективным направлением патогенетического лечения БП, способствующая снижению концентрации агрегатов α -синуклеина.

Согласно проведенным исследованиям, хорошо охарактеризована нейропротекторная роль тромбоцитарного фактора роста для дофаминергических нейронов [121], что позволяет предположить возможность применения заместительной терапии PDGF у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, в том числе БП [123].

Таким образом, в настоящее время большинство исследований имеет трансляционную направленность, связаны с поиском биомаркеров заболеваний и разработкой персонализированных подходов к терапии. Потенциальным преимуществом идентификации биомаркеров для диагностики нейродегенеративных заболеваний является возможность прогнозирования течения и темпа прогрессирования заболевания, в мониторинге ответа на терапию. Накопление информации о идентификации биомаркеров является достаточно сложной и очень важной задачей, так как это помогает не только более точно понять патогенез нейродегенеративных заболеваний, но и выявить людей с данными расстройствами на доклинической стадии болезни, потенциально применять у них болезнью модифицирующую терапию.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marogianni C., Sokratous M., Dardiotis E., Hadjigeorgiou G.M., Bogdanos D., Xiromerisiou G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 22. P. 8421.
2. Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M. // *Neurology*. 2007. V. 68. № 5. P. 384–386.
3. Tysnes O.-B., Storstein A. // *J. Neural Transm.* 2017. V. 124. № 8. P. 901–905.
4. Cocoros N.M., Svensson E., Szépligeti S.K., Vestergaard S.V., Szentkúti P., Thomsen R.W., Borghammer P., Sørensen H.T., Henderson V.W. // *JAMA Neurol.* 2021. V. 78. № 12. P. 1461.
5. Boyko A.A., Troyanova N.I., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 12. P. 2633.
6. Nandipati S., Litvan I. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2016. V. 13. № 9. P. 881.
7. Uddin Md.S., Kabir M.T., Jalouli M., Rahman M.A., Jeandet P., Behl T., Alexiou A., Albadrani G.M., Abdel-Daim M.M., Perveen A., Ashraf G.M. // *Curr. Neuropharmacol.* 2022. V. 20. № 1. P. 126–146.
8. Kwon H.S., Koh S.-H. // *Transl. Neurodegener.* 2020. V. 9. № 1. P. 42.
9. Ponce J., Ulu A., Hanson C., Cameron-Smith E., Bertoni J., Wuebker J., Fisher A., Siu K.C., Marmelat V., Adamec J., Bhatti D. // *Front. Aging Neurosci.* 2022. V. 14. P. 780811.
10. Jankovic J., Tan E.K. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2020. V. 91. № 8. P. 795–808.
11. Sonnen J.A. // *Neuronal Cell Death* / ed. Jahani-Asl A. New York, NY: Springer US, 2022. V. 2515. P. 255–279.
12. Pal R., Tiwari P.C., Nath R., Pant K.K. // *Neurol. Res.* 2016. V. 38. № 12. P. 1111–1122.
13. Tansey M.G., Wallings R.L., Houser M.C., Herrick M.K., Keating C.E., Joers V. // *Nat. Rev. Immunol.* 2022. V. 22. № 11. P. 657–673.
14. Jo S., Kang W., Hwang Y.S., Lee S.H., Park K.W., Kim M.S., Lee H., Yoon H.J., Park Y.K., Chalita M., Lee J.H., Sung H., Lee J.Y., Bae J.W., Chung S.J. // *Npj Park. Dis.* 2022. V. 8. № 1. P. 87.
15. FDA-NIH Biomarker Working Group // Silver Spring Food Drug Adm. 2016.
16. Parnetti L., Gaetani L., Eusebi P., Paciotti S., Hansson O., El-Agnaf O., Mollenhauer B., Blennow K., Calabresi P. // *Lancet Neurol.* 2019. V. 18. № 6. P. 573–586.
17. Konradi A.O. // *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2022. V. 2. № 3. P. 6–16.
18. Бойко А.С., Лосенков И.С., Дмитриева Е.Г. // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016. V. 4. P. 212–217.
19. Palasz E., Wysocka A., Gasiorska A., Chalimoniuk M., Niewiadomski W., Niewiadomska G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 3. P. 1170.
20. Rentzos M., Nikolaou C., Andreadou E., Paraskevas G.P., Rombos A., Zoga M., Tsoutsou A., Boufidou F., Kapaki E., Vassilopoulos D. // *Acta Neurol. Scand.* 2007. V. 116. № 6. P. 374–379.

21. Yelamanchili S.V., Chaudhuri A.D., Flynn C.T., Fox H.S. // *Mol. Neurodegener.* 2011. V. 6. № 1. P. 52.
22. Choi D.-K. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 28. P. 6594–6600.
23. Ravindran G., Rao H.S. // *Stem Cells Dev.* 2006. V. 15. № 4. P. 575–582.
24. Zachrisson O., Zhao M., Andersson A., Danneus K., Häggblad J., Isacson R., Nielsen E., Patrone C., Rönnholm H., Wikström L., Delfani K., McCormack A.L., Palmer T., Di Monte D.A., Hill M.P., Janson Lang A.M., Haegerstrand A. // *J. Park. Dis.* 2011. V. 1. № 1. P. 49–63.
25. Kerschenshneider M., Gallmeier E., Behrens L., Leal V.V., Misgeld T., Klinkert W.E., Kolbeck R., Hoppe E., Oropeza-Wekerle R.L., Barthelemy I., Stadelmann C., Lassmann H., Wekerle H., Hohlfeld R. // *J. Exp. Med.* 1999. V. 189. № 5. P. 865–870.
26. Nakahashi T., Fujimura H., Altar C.A., Li J., Kamabayashi J., Tandon N.N., Sun B. // *FEBS Lett.* 2000. V. 470. № 2. P. 113–117.
27. Yarrow J.F., White L.J., McCoy S.C., Borst S.E. // *Neurosci. Lett.* 2010. V. 479. № 2. P. 161–165.
28. Tapia-Arancibia L., Aliaga E., Silhol M., Arancibia S. // *Brain Res. Rev.* 2008. V. 59. № 1. P. 201–220.
29. Bath K.G., Lee F.S. // *Dev. Neurobiol.* 2010. V. 70. P. 339–349.
30. Lu B., Nagappan G., Lu Y. // *Neurotrophic Factors* / eds. Lewin G.R., Carter B.D. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. V. 220. P. 223–250.
31. Mehterov N., Minchev D., Gevezova M., Sarafian V., Maes M. // *Mol. Neurobiol.* 2022. V. 59. № 8. P. 4926–4952.
32. Gao L., Zhang Y., Sterling K., Song W. // *Transl. Neurodegener.* 2022. V. 11. № 1. P. 4.
33. Rezaee Z., Marandi S.M., Alaei H. // *Neurotox. Res.* 2022. V. 40. № 4. P. 1115–1124.
34. Guerra-Vázquez C.M., Martínez-Ávila M., Guajardo-Flores D., Antunes-Ricardo M. // *Foods.* 2022. V. 11. № 3. P. 252.
35. Malczynska-Sims P., Chalimoniuk M., Wronski Z., Marusiak J., Sulek A. // *Aging Clin. Exp. Res.* 2022. V. 34. № 9. P. 2165–2176.
36. Pramanik S., Sulistio Y.A., Heese K. // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. № 9. P. 7401–7459.
37. Xu Y., Fu Z., Gao X., Wang R., Li Q. // *Bioengineered.* 2021. V. 12. № 1. P. 1587–1598.
38. Maugeri G., D'Agata V., Magri B., Roggio F., Castorina A., Ravalli S., Di Rosa M., Musumeci G. // *Cells.* 2021. V. 10. № 6. P. 1542.
39. Yoo J.M., Lee B.D., Sok D.E., Ma J.Y., Kim M.R. // *Redox Biol.* 2017. V. 11. P. 592–599.
40. Martínez-Iglesias O., Naidoo V., Cacabelos N., Cacabelos R. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 23. № 1. P. 13.
41. Fujitani M., Otani Y., Miyajima H. // *Biomolecules.* 2021. V. 11. № 11. P. 1730.
42. Lucaci A.G., Notaras M.J., Kosakovsky Pond S.L., Colak D. // *Transl. Psychiatry.* 2022. V. 12. № 1. P. 258.
43. Ventriglia M., Zanardini R., Bonomini C., Zanetti O., Volpe D., Pasqualetti P., Gennarelli M., Bocchio-Chiavetto L. // *BioMed Res. Int.* 2013. V. 2013. P. 1–7.
44. Lin J.G., Chen C.J., Yang H.B., Chen Y.H., Hung S.Y. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 9. P. 1846.
45. Rahimmi A., Tozandehjani S., Daraei M., Khademferan M. // *Mol. Biol. Rep.* 2022. V. 49. № 8. P. 8051–8060.
46. Wang Y., Liu H., Zhang B.S., Soares J.C., Zhang X.Y. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2016. V. 29. P. 66–71.
47. Huang Y., Yun W., Zhang M., Luo W., Zhou X. // *J. Int. Med. Res.* 2018. V. 46. № 4. P. 1477–1485.
48. Siuda J., Patalong-Ogień M., Żmuda W., Targosz-Gajniak M., Niewiadomska E., Matuszek I., Jędrzejowska-Szypułka H., Lewin-Kowalik J., Rudzińska-Bar M. // *Neurol. Neurochir. Pol.* 2017. V. 51. № 1. P. 24–32.
49. Song J.-H., Yu J.-T., Tan L. // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 52. № 3. P. 1477–1493.
50. Yamada K., Mizuno M., Nabeshima T. // *Life Sci.* 2002. V. 70. № 7. P. 735–744.
51. Dahlström M., Madjid N., Nordvall G., Halldin M.M., Vazquez-Juarez E., Lindskog M., Sandin J., Winblad B., Eriksdotter M., Forsell P. // *Cells.* 2021. V. 10. № 8. P. 1871.
52. Kang S.S., Zhang Z., Liu X., Manfredsson F.P., Benskey M.J., Cao X., Xu J., Sun Y.E., Ye K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 40. P. 10773–10778.
53. Fang F., Yang W., Florio J.B., Rockenstein E., Spencer B., Orain X.M., Dong S.X., Li H., Chen X., Sung K., Rissman R.A., Masliah E., Ding J., Wu C. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 3868.
54. Katila N., Bhurtel S., Shadfar S., Srivastava S., Neupane S., Ojha U., Jeong G.S., Choi D.Y. // *Neuropharmacology.* 2017. V. 125. P. 396–407.
55. Sampaio T.B., Savall A.S., Gutierrez M.E.Z., Pinton S. // *Neural Regen. Res.* 2017. V. 12. № 4. P. 549.
56. Stefani A., Pierantozzi M., Cardarelli S., Stefani L., Cerroni R., Conti M., Garasto E., Mercuri N.B., Marini C., Sucapane P. // *Front. Neurosci.* 2022. V. 16. P. 846681.
57. Gerecke K.M., Jiao Y., Pani A., Pagala V., Smeyne R.J. // *Brain Res.* 2010. V. 1341. P. 72–83.
58. Chmielarz P., Saarma M. // *Pharmacol. Rep.* 2020. V. 72. № 5. P. 1195–1217.
59. Pałasz E., Bąk A., Gąsiorowska A., Niewiadomska G. // *Postepy Hig. Med. Dośw.* 2017. V. 71. № 1. P. 713–726.
60. Renko J.M., Mahato A.K., Visnapuu T., Valkonen K., Karelson M., Voutilainen M.H., Saarma M., Tuominen R.K., Sidorova Y.A. // *J. Park. Dis.* 2021. V. 11. № 3. P. 1023–1046.
61. Leal G., Comprido D., Duarte C.B. // *Neuropharmacology.* 2014. V. 76. P. 639–656.
62. Kaur R., Mehan S., Singh S. // *Neurol. Sci.* 2019. V. 40. № 1. P. 13–23.
63. Andero R., Choi D.C., Ressler K.J. // *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Elsevier, 2014. V. 122. P. 169–192.
64. Park H., Kang S., Nam E., Suh Y.H., Chang K.A. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 2.
65. Chagraoui A., Di Giovanni G., De Deurwaerdère P. // *Biomolecules.* 2022. V. 12. № 2. P. 243.
66. Ren Y., Jiang H., Pu J., Li L., Wu J., Yan Y., Zhao G., Guttuso T.J., Zhang B., Feng J. // *Mov. Disord.* 2022. V. 37. № 1. P. 70–79.

67. Scheffer D.D.L., Freitas F.C., Aguiar A.S., Jr, Ward C., Guglielmo L.G.A., Prediger R.D., Cronin S.J.F., Walz R., Andrews N.A., Latini A. // *Brain Commun.* 2021. V. 3. № 3. P. fcab116.
68. Gellhaar S., Sunnemark D., Eriksson H., Olson L., Galter D. // *Cell Tissue Res.* 2017. V. 369. № 3. P. 445–454.
69. Klebanoff S.J., Kettle A.J., Rosen H., Winterbourn C.C., Nauseef W.M. // *J. Leukoc. Biol.* 2013. V. 93. № 2. P. 185–198.
70. Kremserová S., Kocurková A., Chorvátová M., Klinke A., Kubala L. // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 707085.
71. McDowell S.A.C., Luo R.B.E., Arabzadeh A., Doré S., Bennett N.C., Breton V., Karimi E., Rezanejad M., Yang R.R., Lach K.D., Issac M.S.M., Samborska B., Perus L.J.M., Moldoveanu D., Wei Y., Fiset B., Rayes R.F., Watson I.R., Kazak L., Guiot M.C., Fiset P.O., Spicer J.D., Dannenberg A.J., Walsh L.A., Quail D.F. // *Nat. Cancer.* 2021. V. 2. № 5. P. 545–562.
72. Maki R.A., Holzer M., Motamedchaboki K., Malle E., Masliah E., Marsche G., Reynolds W.F. // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. V. 141. P. 115–140.
73. Teismann P. // *DMW – Dtsch. Med. Wochenschr.* 2013. V. 139. № 03. P. 99–102.
74. Volkman R., Ben-Zur T., Kahana A., Garty B.Z., Offen D. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 990.
75. Ji W., Zhang Y. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 64. P. 107870–107876.
76. Smyth L.C.D., Murray H.C., Hill M., van Leeuwen E., Highet B., Magon N.J., Osanlouy M., Mathiesen S.N., Mockett B., Singh-Bains M.K., Morris V.K., Clarkson A.N., Curtis M.A., Abraham W.C., Hughes S.M., Faull R.L.M., Kettle A.J., Dragunow M., Hampton M.B. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2022. V. 10. № 1. P. 38.
77. Pierzchała K., Pięta M., Rola M., Świerczyńska M., Artelska A., Dębowska K., Podsiadły R., Pięta J., Zielonka J., Sikora A., Marcinek A., Michalski R. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 9314.
78. Loyer C., Lapostolle A., Urbina T., Elabbadi A., Lavillegrand J.R., Chaigneau T., Simoes C., Dessajan J., Desnos C., Morin-Brureau M., Chantran Y., Aucouturier P., Guidet B., Voiriot G., Ait-Oufella H., Elbim C. // *Crit. Care.* 2022. V. 26. № 1. P. 155.
79. Zhang N., Wang J.X., Wu X.Y., Cui Y., Zou Z.H., Liu Y., Gao J. // *Front. Med.* 2022. V. 9. P. 828174.
80. Talarowska M., Szemraj J., Gałęcki P. // *Adv. Med. Sci.* 2015. V. 60. № 1. P. 1–5.
81. Morris G., Puri B.K., Olive L., Carvalho A., Berk M., Walder K., Gustad L.T., Maes M. // *BMC Med.* 2020. V. 18. № 1. P. 305.
82. Jucaite A., Svenningsson P., Rinne J.O., Cselényi Z., Várnäs K., Johnström P., Amini N., Kirjavainen A., Heilin S., Minkwitz M., Kugler A.R., Posener J.A., Budd S., Halldin C., Varrone A., Farde L. // *Brain.* 2015. V. 138. № 9. P. 2687–2700.
83. Zhang H., Ray A., Miller N.M., Hartwig D., Pritchard K.A., Dittel B.N. // *J. Neurochem.* 2016. V. 136. № 4. P. 826–836.
84. Kaindlstorfer C., Sommer P., Georgievskia B., Mather R.J., Kugler A.R., Poewe W., Wenning G.K., Stefanova N. // *Neurotox. Res.* 2015. V. 28. № 3. P. 185–194.
85. Kiely A.P., Murray C.E., Foti S.C., Benson B.C., Courtney R., Strand C., Lashley T., Holton J.L. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2018. V. 77. № 7. P. 598–607.
86. Синдром паркинсонизма у молодых женщин, страдающих дефицитом миелопероксидазы фагоцитов. Интернет-издание “Новости медицины и фармации” [Electronic resource]. URL: <http://www.mif-ua.com/archive/article/15708> (accessed: 31.01.2023).
87. Zaidi N., Maurer A., Nieke S., Kalbacher H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 376. № 1. P. 5–9.
88. Cengiz T., Türkboyları S., Gençler O.S., Anlar Ö. // *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2019. V. 184. P. 105373.
89. Minarowska A., Gacko M., Karwowska A., Minarowski E. // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2008. V. 46. № 1. P. 23–38.
90. Vidoni C., Follo C., Savino M., Melone M.A., Isidoro C. // *Med. Res. Rev.* 2016. V. 36. № 5. P. 845–870.
91. Benes P., Vetvicka V., Fusek M. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008. V. 68. № 1. P. 12–28.
92. Bunk J., Prieto Huarcaya S., Drobný A., Dobert J.P., Walther L., Rose-John S., Arnold P., Zünke F. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 581805.
93. McGlinchey R.P., Lacy S.M., Huffer K.E., Tayebi N., Sidransky E., Lee J.C. // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 25. P. 9973–9984.
94. Bae E.J., Yang N.Y., Lee C., Kim S., Lee H.J., Lee S.J. // *Cell Death Dis.* 2015. V. 6. № 10. P. e1901.
95. Cheng X.T., Xie Y.X., Zhou B., Huang N., Farfel-Becker T., Sheng Z.H. // *J. Cell Biol.* 2018. V. 217. № 9. P. 3127–3139.
96. Marques A.R.A., Di Spiezio A., Thießen N., Schmidt L., Grötzinger J., Lüllmann-Rauch R., Damme M., Storck S.E., Pietrzik C.U., Fogh J., Bär J., Mikhaylova M., Glatzel M., Bassal M., Bartsch U., Saftig P. // *Autophagy.* 2020. V. 16. № 5. P. 811–825.
97. Chen J.H., Kuo H.C., Lee K.F., Tsai T.H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 12. P. 11873–11891.
98. Kahl A., Blanco I., Jackman K., Baskar J., Milaganur Mohan H., Rodney-Sandy R., Zhang S., Iadecola C., Hochrainer K. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 2701.
99. Hossain M.I., Marcus J.M., Lee J.H., Garcia P.L., Singh V., Shacka J.J., Zhang J., Gropen T.I., Falany C.N., Andrabi S.A. // *Autophagy.* 2021. V. 17. № 6. P. 1330–1348.
100. Prieto Huarcaya S., Drobný A., Marques A.R.A., Di Spiezio A., Dobert J.P., Balta D., Werner C., Rizo T., Gallwitz L., Bub S., Stojkowska I., Belur N.R., Fogh J., Mazzulli J.R., Xiang W., Fulzele A., Dejung M., Sauer M., Winner B., Rose-John S., Arnold P., Saftig P., Zünke F. // *Autophagy.* 2022. V. 18. № 5. P. 1127–1151.
101. Rein-Smith C.M., Church F.C. // *Curr. Opin. Hematol.* 2014. V. 21. № 5. P. 438–444.
102. Oliveira L.M.A., Gasser T., Edwards R., Zweckstetter M., Melki R., Stefanis L., Lashuel H.A., Sulzer D., Vekrellis K., Halliday G.M., Tomlinson J.J., Schlossmacher M., Jensen P.H., Schulze-Hentrich J., Riess O., Hirst W.D., El-Agnaf O., Mollenhauer B., Lansbury P., Outeiro T.F. // *Npj Park. Dis.* 2021. V. 7. № 1. P. 65.
103. Gramling M.W., Church F.C. // *Thromb. Res.* 2010. V. 125. № 5. P. 377–381.
104. Tang M.-Y., Gorin F.A., Lein P.J. // *Ageing Neurodegener. Dis.* 2022. V. 2. P. 2.

105. Grover S.P., Mackman N. // *Front. Cardiovasc. Med.* 2022. V. 9. P. 878199.
106. Zattoni M., Mearelli M., Vanni S., Colini Baldeschi A., Tran T.H., Ferracin C., Catania M., Moda F., Di Fede G., Giaccone G., Tagliavini F., Zanusso G., Ironside J.W., Ferrer I., Legname G. // *Mol. Neurobiol.* 2022. V. 59. № 6. P. 3778–3799.
107. Johnson M.E., Stecher B., Labrie V., Brundin L., Brundin P. // *Trends Neurosci.* 2019. V. 42. № 1. P. 4–13.
108. Shim A.H., Liu H., Focia P.J., Chen X., Lin P.C., He X. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 25. P. 11307–11312.
109. Heldin C.-H. // *Ups. J. Med. Sci.* 2012. V. 117. № 2. P. 83–91.
110. Reigstad L.J., Varhaug J.E., Lillehaug J.R. // *FEBS J.* 2005. V. 272. № 22. P. 5723–5741.
111. Funa K., Sasahara M. // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2014. V. 9. № 2. P. 168–181.
112. Hammacher A., Hellman U., Johnsson A., Ostman A., Gunnarsson K., Westermarck B., Wasteson A., Heldin C.H. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 31. P. 16493–16498.
113. Heldin C.-H., Westermarck B. // *Physiol. Rev.* 1999. V. 79. № 4. P. 1283–1316.
114. Assanah M.C., Bruce J.N., Suzuki S.O., Chen A., Goldman J.E., Canoll P. // *Glia.* 2009. V. 57. № 16. P. 1835–1847.
115. Zhu X., Bergles D.E., Nishiyama A. // *Development.* 2008. V. 135. № 1. P. 145–157.
116. Chojnacki A., Mak G., Weiss S. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 26. P. 9503–9512.
117. Moore L., Bain J.M., Loh J.M., Levison S.W. // *ASN Neuro.* 2014. V. 6. № 2. P. AN20120041.
118. Dupin E., Calloni G.W., Le Douarin N.M. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 2. P. 238–249.
119. Lue L.F., Schmitz C.T., Snyder N.L., Chen K., Walker D.G., Davis K.J., Belden C., Caviness J.N., Driver-Dunkley E., Adler C.H., Sabbagh M.N., Shill H.A. // *Neurol. – Neuroimmunol. Neuroinflammation.* 2016. V. 3. № 1. P. e193.
120. Beazely M.A., Lim A., Li H., Trepanier C., Chen X., Sidhu B., Macdonald J.F. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 12. P. 8054–8063.
121. Tang Z., Arjunan P., Lee C., Li Y., Kumar A., Hou X., Wang B., Wardega P., Zhang F., Dong L., Zhang Y., Zhang S.Z., Ding H., Fariss R.N., Becker K.G., Lennartsson J., Nagai N., Cao Y., Li X. // *J. Exp. Med.* 2010. V. 207. № 4. P. 867–880.
122. Zheng L., Ishii Y., Tokunaga A., Hamashima T., Shen J., Zhao Q.L., Ishizawa S., Fujimori T., Nabeshima Y., Mori H., Kondo T., Sasahara M. // *J. Neurosci. Res.* 2010. V. 88. P. 1273–1284.
123. Vasefi M.S., Kruk J.S., Heikkilä J.J., Beazely M.A. // *J. Neurochem.* 2013. V. 125. № 1. P. 26–36.
124. Schall T.J. // *Cytokine.* 1991. V. 3. № 3. P. 165–183.
125. Qin X.Y., Zhang S.P., Cao C., Loh Y.P., Cheng Y. // *JAMA Neurol.* 2016. V. 73. № 11. P. 1316.
126. Tang P., Chong L., Li X., Liu Y., Liu P., Hou C., Li R. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. V. 2014. P. 1–4.
127. Sahin-Calapoglu N., Demirci S., Calapoglu M., Yasar B. // *Park. Dis.* 2016. V. 2016. P. 1–7.
128. Subramanian N., Ramanathan S., Paul SFD, Venkatesan V., Koshy T. // *Neurosci. Lett.* 2020. V. 739. P. 135404.
129. Seo J., Park J., Kim K., Won J., Yeo H.G., Jin Y.B., Koo B.S., Lim K.S., Jeong K.J., Kang P., Lee H.Y., Choi W.S., Baek S.H., Jeon C.Y., Hong J.J., Huh J.W., Kim Y.H., Park S.J., Kim S.U., Lee D.S., Lee S.R., Lee Y. // *Neuroscience.* 2020. V. 431. P. 73–85.
130. Dutta D., Kundu M., Mondal S., Roy A., Ruehl S., Hall D.A., Pahan K. // *Neurobiol. Dis.* 2019. V. 132. P. 104575.
131. Brochard V., Combadière B., Prigent A., Laouar Y., Perrin A., Beray-Berthet V., Bonduelle O., Alvarez-Fischer D., Callebert J., Launay J.M., Duyckaerts C., Flavell R.A., Hirsch E.C., Hunot S. // *J. Clin. Invest.* 2008. P. JCI36470.
132. Roy A., Mondal S., Kordower J.H., Pahan K. // *Neuroscience.* 2015. V. 302. P. 36–46.
133. Schmid H., Boucherot A., Yasuda Y., Henger A., Brunner B., Eichinger F., Nitsche A., Kiss E., Bleich M., Gröne H.J., Nelson P.J., Schlöndorff D., Cohen C.D., Kretzler M. // *Diabetes.* 2006. V. 55. № 11. P. 2993–3003.
134. Chandra G., Rangasamy S.B., Roy A., Kordower J.H., Pahan K. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 29. P. 15267–15281.
135. Weinberg R.P., Koledova V.V., Schneider K., Sambandan T.G., Grayson A., Zeidman G., Artamonova A., Sambanthamurthi R., Fairus S., Sinskey A.J., Rha C. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 16423.
136. Miklossy J., Doudet D.D., Schwab C., Yu S., McGeer E.G., McGeer P.L. // *Exp. Neurol.* 2006. V. 197. № 2. P. 275–283.
137. Choi J.-Y., Jo S.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 478. № 3. P. 1355–1362.
138. Liu Z., Huang Y., Cao B.B., Qiu Y.H., Peng Y.P. // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. № 10. P. 7762–7776.
139. Tan C., Liu X., Chen J. // *Park. Dis.* 2018. V. 2018. P. 1–12.
140. Li W., Chen S., Luo Y., Xia Y., Ma Q., Yao Q., Wu J. // *Exp. Ther. Med.* 2020. V. 20. № 2. P. 1021–1029.
141. Hernández-Romero M.C., Delgado-Cortés M.J., Sarmiento M., de Pablos R.M., Espinosa-Oliva A.M., Argüelles S., Báñez M.J., Villarín R.F., Mauriño R., Santiago M., Venero J.L., Herrera A.J., Cano J., Machado A. // *NeuroToxicology.* 2012. V. 33. № 3. P. 347–360.
142. Lerche S., Zimmermann M., Wurster I., Roeben B., Fries F.L., Deuschle C., Waniek K., Lachmann I., Gasser T., Jakobi M., Joos T.O., Schneiderhan-Marra N., Brokmann K. // *Front. Neurol.* 2022. V. 13. P. 834580.
143. Nolan Y.M., Sullivan A.M., Toulouse A. // *Trends Mol. Med.* 2013. V. 19. № 3. P. 187–196.
144. Sampson T.R., Debelius J.W., Thron T., Janssen S., Shastri G.G., Ilhan Z.E., Challis C., Schretter C.E., Rocha S., Gradinaru V., Cheslet M.F., Keshavarzian A., Shannon K.M., Krajmalnik-Brown R., Wittung-Stafshede P., Knight R., Mazmanian S.K. // *Cell.* 2016. V. 167. № 6. P. 1469–1480. e12.
145. Taylor J.M., Main B.S., Crack P.J. // *Neurochem. Int.* 2013. V. 62. № 5. P. 803–819.
146. Reuland C.J., Church F.C. // *Med. Hypotheses.* 2020. V. 138. P. 109602.

Markers of Neurodegeneration in Parkinson's Disease

M. A. Nikitina^a, V. M. Alifirova^a, S. O. Borodina^a, and E. S. Koroleva^a

^a *Department of Neurology and Neurosurgery, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

This review describes the role of peripheral blood biomarkers involved in neurodegeneration and neuroregeneration in Parkinson's disease: BDNF, Cathepsin D, NSAM, myeloperoxidase, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), platelet-derived growth factor (PDGF), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and intercellular adhesion molecules (sICAM-1). These biomarkers are important indicators of biological processes and perspective for early diagnosis, prognosis of the disease and the development of new possibilities in modifying therapy for Parkinson's disease as they are associated with neuroprotective and neurotrophic systems.

Keywords: neurodegeneration, Parkinson's disease, brain-derived neurotrophic factor, BDNF, myeloperoxidase, Cathepsin D, NSAM, PAI-1, PDGF, RANTES, ICAM-1

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 591.39, 591.481.11

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* И ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНОВ НА ПЛОТНОСТЬ НЕЙРОНОВ И НЕЙРОГЕНЕЗ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6J

© 2023 г. Е. Ю. Брусенцев¹, Т. Н. Игонина¹, И. Н. Рожкова¹, С. В. Окотруб¹, Д. А. Лебедева^{1,2},
Е. В. Владимирова¹, В. С. Козенева^{1,2}, С. Я. Амтиславский^{1, *}

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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 02.02.2023 г.

После доработки 07.03.2023 г.

Принята к публикации 09.03.2023 г.

Настоящее исследование направлено на изучение долгосрочных эффектов культивирования *in vitro* (*in vitro* culture – IVC) и переноса эмбрионов (embryo transfer – ET) на плотность нейронов в гиппокампе и нейрогенез у взрослых мышей C57BL/6J. Потомство мышей C57BL/6J, рожденных естественным путем (группа C57BL), сравнивали с мышами C57BL/6J, рожденными после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов самкам-реципиентам C57BL/6J (группа ET-C57BL). В возрасте трех месяцев групповых различий по массе тела и соотношению масс мозга и тела обнаружено не было, хотя наблюдали половые различия по этим показателям. Потомство обоих полов, родившееся после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов, имело более низкий уровень нейрогенеза в зубчатой извилине (dentate gyrus – DG) гиппокампа по сравнению с контрольной группой C57BL. В заключение, культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов не оказывали существенного влияния на массу тела и мозга у потомства, но влияли на нейрогенез в гиппокампе у взрослых потомков обоих полов. Кроме того, обнаружено снижение числа пирамидных нейронов в СА3 области гиппокампа у самок группы ET-C57BL.

Ключевые слова: C57BL/6J, преимплантационные эмбрионы, культивирование *in vitro*, плотность нейронов, гиппокамп, нейрогенез

DOI: 10.31857/S1027813323030068, **EDN:** YURBMM

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование эмбрионов *in vitro* (*in vitro* culture – IVC) и перенос эмбрионов (embryo transfer – ET) являются ключевыми вспомогательными репродуктивными технологиями (ВРТ), широко применяемыми на лабораторных животных и в современной репродуктивной медицине [1, 2]. Возможные долгосрочные эффекты применения этих технологий на здоровье потомства широко обсуждаются [1, 3]. Хорошо документированы изменения сердечно-сосудистой [4, 5] и нервной [6, 7] систем у детей и взрослых, зачатых при помощи ВРТ. Однако до сих пор неясно, вызваны ли наблюдаемые изменения собственно применением репродуктивных технологий или их следует отнести к субфертильности пар [8], их возрасту [9] или наличию хронических заболеваний у па-

циентов, проходящих протоколы ВРТ [10]. Недавний обзор показывает, что, хотя многие исследования, описывающие наблюдения за развитием детей, рожденных после ВРТ, указывают на связь частоты определенных заболеваний и применения этих технологий, информация в данной области по-прежнему ограничена и достаточно противоречива [3].

Онтогенетическая концепция здоровья и болезней (Developmental Origins of Health and Disease – DOHaD) указывает на то, что пренатальное воздействие измененных условий окружающей среды влияет на постнатальное развитие ребенка, обмен веществ и восприимчивость к болезням во взрослом возрасте [11]. Недавно гипотеза DOHaD была расширена и на преимплантационные стадии развития [12, 13]. В литературе обсуждается повышение частоты проявлений расстройств аутистического спектра (РАС) у детей, зачатых с помощью ВРТ [14–16]. Между тем, после диффе-

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр-кт Академика Лаврентьева, 10; e-mail: amstis@yandex.ru.

ренцированного учета всех факторов, таких, как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) или интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), а также одиночный/множественный способ переноса эмбрионов, эта связь становится далеко не очевидной [17]. Вспомогательные репродуктивные технологии характеризуются многочисленными и сложными терапевтическими процедурами, которые до сих пор не унифицированы и могут варьировать в разных клиниках, что особенно затрудняет выявление индивидуальных факторов риска для детей [18].

Повышенное кровяное давление и сосудистую дисфункцию наблюдали у потомства фертильных и здоровых лабораторных мышей, зачатых с помощью ВРТ, что свидетельствует о некоторых эффектах, связанных именно с применением данных технологий [19, 20]. Помимо сердечно-сосудистых изменений, у мышей, рожденных в результате ВРТ обнаружили изменения эмоционального поведения [21–24]. Также было высказано предположение, что культивирование *in vitro* оказывает более существенное влияние по сравнению с другими компонентами ВРТ на фетоплацентарное развитие, что приводит к ухудшению здоровья потомства, предположительно из-за эпигенетических нарушений [25]. Между тем, некоторые наблюдения на лабораторных мышках и крысах свидетельствуют о том, что такие репродуктивные технологии, как культивирование *in vitro* или криоконсервация эмбрионов в сочетании с переносом эмбрионов, могут снижать артериальное давление у потомства [23], смягчать проявление генетически предопределенной артериальной гипертензии [26] и снижать подверженность некоторым заболеваниям [27].

В ряде исследований выявлена связь ВРТ с повышением частоты возникновения заболеваний нервной системы, в частности, детского церебрального паралича [28, 29] и РАС [14–16], однако биологический механизм этой связи до сих пор не ясен. Кроме того, в некоторых работах показано, что для детей с РАС характерны аномальный характер роста и развития мозга, изменения плотности нейронов в некоторых структурах лимбической системы, в частности, в гиппокампе [30–32].

Данное исследование направлено на определение долгосрочных эффектов культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов на развитие нервной системы потомства, в частности, на оценку влияния этих процедур на плотность нейронов в гиппокампе, а также нейрогенез у мышей линии C57BL/6J.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Работа проведена на потомках мышей линии C57BL/6J, ро-

жденных как после естественной беременности, так и после культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов с последующим их переносом в рог матки самки-реципиента той же линии. Были сформированы следующие группы животных для исследования:

1) группа C57BL – контроль (естественно рожденные мыши линии C57BL/6J): шесть пометов, 2–6 мышей в помете, $n = 26$ (9 самцов и 17 самок);

2) группа ET-C57BL – мыши линии C57BL/6J (рожденные после культивирования *in vitro* – IVC = 44 ч и переноса эмбрионов – ET): семь пометов, 2–5 мышей в помете, $n = 23$ (14 самцов и 9 самок).

Мышей содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики (ИЦиГ) г. Новосибирск в индивидуально вентилируемых клетках размерами 36 см × 25 см × 14 см (длина × ширина × высота) с подстилом из древесной стружки при температуре 22–24°C; цикл день/ночь 14 : 10 (рассвет в 3 ч ночи), влажность 40–50%, свободный доступ к стандартному корму (V1534–300, Sniff, Soest, Германия) и очищенной воде, обогащенной минеральными добавками (Северянка; Экопроект, Россия). Самок с детенышами содержали совместно до 25-го дня после рождения потомков. Все эксперименты были одобрены Комитетом по биоэтике ИЦиГ и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Спаривание доноров и получение эмбрионов. Самкам мышей линии C57BL/6J ($n = 7$) в возрасте 8–16 нед. делали инъекцию 5 МЕ гонадотропина сыровотки жеребых кобыл (ГСЖК; Фоллигон, Intervet, Нидерланды) и через 48 ч 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ; Хорулон, Intervet, Нидерланды) для индукции суперовуляции. Самок на ночь ссаживали с фертильными самцами той же линии. Спаривание проверяли по вагинальной пробке на следующее утро, а день, когда эта пробка была обнаружена, считали первым днем после фертильного спаривания (*dpc* 1), то есть первым днем беременности. Беременных самок подвергали эвтаназии при помощи CO₂ на *dpc* 2, чтобы получить эмбрионы на стадии 2-х бластомеров. Яйцеводы и рога матки промывали средой FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). Полученные эмбрионы оценивали под стереомикроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия) при увеличении ×80. Эмбрионы без видимых дефектов (бластомеров без повреждений не менее 75%) и с целыми прозрачными оболочками (*zonae pellucidae*) отбирали для культивирования *in vitro*, а некачественные эмбрионы (поврежденных бластомеров более 25%) отбраковывали.

Получение псевдобеременных самок-реципиентов. В качестве самок-реципиентов для переноса эмбрионов использовали мышей линии C57BL/6J

($n = 7$). Самок в проэструсе или эструсе ссаживали с вазэктомированными гибридными самцами (CD1 $\times$ C57BL/6J), проверенных на стерильность. Через 8–12 ч после спаривания самок проверяли на наличие вагинальных пробок. День, когда была обнаружена вагинальная пробка, считали первым днем псевдобеременности.

Культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов.

Преимплантационные эмбрионы мышей линий C57BL/6J на стадии 2-х бластомеров получали на *dpc* 2 и помещали в капли по 20 мкл KSOM (Merck, Германия) на 35-мм чашки Петри (Corning, США). Затем их культивировали под минеральным маслом (Merck, Германия) группами по 5–11 в CO_2 -инкубаторе New BrunswickTM Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) в стандартных условиях (5% CO_2 , 37°C и влажности 90%) в течение 48 ч. Развитие эмбрионов оценивали под стереомикроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия). Через 48 ч нормально развивающиеся бластоцисты ($n = 61$) были перенесены в рог матки самок-реципиентов на третий день их псевдобеременности.

Самкам-реципиентам вводили внутривбрюшинно 0.01 мг/кг медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и через 10 мин 50 мг/кг кетамина гидрохлорида (Кетамин, 50 мг/мл; Московский эндокринный завод, Россия). Затем подкожно вводили 0.01 мл амоксициллина (амоксициллина тригидрат, 150 мг/мл; Апи-Сан, Россия). Шерсть в месте разреза сбривали на правой стороне спины на 1 см от нижнего ребра в вентральном направлении, кожу обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом. Кожу и подлежащий мышечный слой в области над маткой разрезали дорсовентрально на расстоянии 5 мм от нижнего ребра в каудальном направлении. Висцеральный жировой слой, соединенный с яйчником, яйцеводом и верхней частью матки, захватывали пинцетом и приподнимали. Эмбрионы (5–11 на самку) переносили стеклянным капилляром в правый рог матки в 5 мкл среды FertiCultTM Flushing (FertiPro, Бельгия). Разрез зашивали рассасывающейся хирургической нитью (Vicryl; Johnson & Johnson, США) и присыпали антибиотиком (амоксициллина тригидрат; Апи-Сан, Россия), после чего операционный шов обрабатывали антисептиком (Ацербин, Montavit Pharmazeutische Fabrik GmbH, Австрия).

Измерение массы тела потомства. Мышат всех групп взвешивали на портативных цифровых весах (ScoutPro SPS2001 F, Ohaus Corporation, США) на 7-й, 14-й и 21-й день после рождения (Д7, Д14 и Д21).

Интракардиальная перфузия. Перфузию осуществляли через систему кровообращения для фиксации головного мозга. Мышей наркотизировали, вводя им внутримышечно 75 мкл (на 10 г веса) медетомидина гидрохлорида (Медитин,

1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и 60 мкл (на 10 г веса) золетила (Virbac, Франция). Далее им вводили через кровеносную систему 30–50 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 4% раствор формалина на PBS. После этого мозг извлекали и помещали в 30% раствор сахарозы на PBS при +4°C для обезвоживания и последующей фиксации в течение следующих 3–4 нед., пока фиксированный материал не опустится на дно колбы. Образцы мозга подготавливали с помощью Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США), затем замораживали и хранили при –70°C.

Приготовление замороженных срезов мозга. С использованием атласа [33] делали замороженные срезы областей гиппокампа (CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилины – dentate gyrus – DG) на расстоянии –1.46...–1.82 мм от брегмы. Срезы толщиной 10 мкм готовили при –25°C на криотоме (HM550 OP, Thermo Scientific, США) и помещали на предметные стекла (Superfrost Plus, Menzel-Glaser; Thermo Fisher Scientific, США).

Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание. Окрашивание образцов проводили по протоколам производителей наборов с небольшими модификациями. Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей регидратацией в течение пяти минут в PBS. Затем после регидратации в 10 мМ щелочно-цитратного буфера (pH 9) при 95°C на водяной бане (TW-2.02, Elmi, Латвия) в течение 15 мин проводили индуцированную нагреванием демаскировку эпитопов. После этого срезы удаляли из буфера и охлаждали до комнатной температуры. Затем образцы трижды промывали в буфере PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1% Tween-20 P9416-100ML (Merck, Германия). После этого в каждую секцию на пять минут добавляли Protein Block (ab64226, Abcam, Великобритания) и удаляли лишнюю жидкость в соответствии с рекомендацией производителя. После этого добавляли 50 мкл первичного антитела и оставляли на ночь при +4°C во влажной темной камере.

Используемые концентрации антител составляли 1 : 800 как для anti-NeuN (ab177487, Abcam, Великобритания), так и для anti-DCX (ab18723, Abcam, Великобритания). Затем срезы промывали буфером PBS-Tween, удаляли лишнюю жидкость, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat Anti-Rabbit IgG H&L AF488 (ab150077, Abcam, Великобритания) в концентрации 1 : 600 и оставляли во влажной среде в темной камере на два часа при +4°C. После этого образцы промывали буфером PBS-Tween, удаляли излишки жидкости и монтировали в среде ProLong, Glass AntifadeMountant (Thermo P36982, Thermo Fisher Scientific, США). После добавления антител срезы обрабатывали в темной камере, защищенной от света.

Таблица 1. Данные по репродукции мышей C57BL/6J

Параметры	Группы	
	C57BL	ET-C57BL
Число реципиентов/пометов	6	7
Продолжительность беременности (дни)	20.20 ± 0.20	21.14 ± 0.26*
Число перенесенных эмбрионов (в среднем на самку)	—	61 (8.71 ± 0.56)
Имплантация эмбрионов, %	—	47
Общее число потомков	26	23
Средний размер помета	4.20 ± 0.80	4.00 ± 0.53

* $p < 0.05$ по сравнению с группой C57BL.

Анализ плотности нейронов. Анализ плотности меченых антителами нейронов проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия), EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC (Carl Zeiss, Германия) для всех областей гиппокампа. Число меченых нейронов подсчитывали с помощью программного обеспечения ImageJ. Плотность нейронов, меченных антителами, рассчитывали, как число нейронов в интересующей области на объем (мм^3). Плотность меченых антителами нейронов подсчитывали в CA1, CA2, CA3 и DG областях гиппокампа.

Статистический анализ. Анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные были проверены на нормальность с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Репродуктивные данные оценивали по критерию χ^2 . Для оценки массы тела потомков в первые недели после рождения использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями. Средние значения продолжительности беременности и размера помета сравнивали между группами по t -критерию Стьюдента. Массу тела и мозга, их соотношение, а также плотность нейронов оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением LSD-методом Фишера. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего ($m \pm \text{SEM}$). За уровень значимости принимали $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Репродуктивные данные. Продолжительность беременности, число перенесенных эмбрионов и размер пометов для исследованных групп представлены в табл. 1. Средняя продолжительность беременности в группе C57BL составила 20.20 ± 0.20 дней, а размер приплода 4.20 ± 0.80 (шесть пометов с общим числом потомков 26; 2–6 мышей в помете). В общей сложности 61 эмбрион C57BL/6J был перенесен семи самкам-реципиентам той же линии (в среднем 8.71 ± 0.56 эмбрио-

нов на перенос). После переноса эмбрионов рождаемость составила 47% (28 рожденных мышат с размером помета 2–4 детеныша на помет). Не было обнаружено различий по средней численности приплодов ($p > 0.05$) между группами. Однако достоверно большую продолжительность беременности ($p < 0.05$) наблюдали в группе ET-C57BL по сравнению с группой C57BL. Статистических различий по соотношению полов в потомстве между группами обнаружено не было.

Анализ раннего постнатального развития. Дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил значимое влияние фактора “возраст” ($F_{2,90} = 1383.40$, $p < 0.001$) на массу тела потомства в раннем постнатальном периоде, что соответствует нормальному физиологическому развитию (табл. 2). Кроме того, на массу тела оказывал влияние фактор “тип развития” ($F_{1,45} = 5.27$, $p < 0.05$); в группе мышей, рожденных после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов масса тела была выше, чем в контроле. Однако последующее апостериорное сравнение не выявило различий по массе тела потомства в раннем постнатальном периоде в пределах каждого возраста.

Анализ массы тела и мозга у взрослых потомков. Данные по массе тела и мозга, а также соотношению массы тела к массе мозга у молодых взрослых потомков представлены в табл. 3. Многофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние “пола” на массу тела ($F_{1,39} = 36.34$, $p < 0.001$) и на соотношение масс мозга и тела ($F_{1,39} = 27.44$, $p < 0.001$), но не на массу мозга ($p > 0.05$). Кроме того, многофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние взаимодействия факторов “пол” и “тип развития” на массу тела ($F_{1,39} = 7.94$, $p < 0.01$) и на соотношение массы мозг/тело ($F_{1,39} = 5.95$, $p < 0.05$), но не на массу мозга ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение подтвердило значительную разницу по массе тела между полами. Масса тела самок из группы C57BL ($p < 0.01$) и у самок группы ET-C57BL ($p < 0.05$) была достоверно ниже по сравнению с самцами тех же групп (табл. 3).

Таблица 2. Масса тела потомства (возраст седьмой, 14-й и 21-й день), полученного после переноса эмбрионов мышей C57BL/6J, и зачатого естественным путем

День после родов	Группы			
	C57BL		ET-C57BL	
	самцы (<i>n</i> = 9)	самки (<i>n</i> = 17)	самцы (<i>n</i> = 14)	самки (<i>n</i> = 9)
Д7	3.62 ± 0.33	3.43 ± 0.25	3.84 ± 0.16	4.13 ± 0.18
Д14	6.87 ± 0.44	6.51 ± 0.31	7.11 ± 0.22	7.82 ± 0.27
Д21	8.62 ± 0.59	8.00 ± 0.36	8.95 ± 0.28	9.41 ± 0.27

Таблица 3. Масса тела и мозга потомства мышей C57BL/6J в возрасте трех месяцев, полученного после переноса эмбрионов, и зачатых естественным путем

Параметры	Группы			
	C57BL		ET-C57BL	
	самцы (<i>n</i> = 5)	самки (<i>n</i> = 13)	самцы (<i>n</i> = 14)	самки (<i>n</i> = 9)
Масса тела	28.26 ± 0.94	21.06 ± 0.38**	25.69 ± 0.73	23.08 ± 0.94*
Масса мозга	0.458 ± 0.007	0.447 ± 0.005	0.443 ± 0.008	0.440 ± 0.005
Соотношение мозг/тело	0.016 ± 0.005	0.021 ± 0.001**	0.017 ± 0.001	0.019 ± 0.001*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с самцами той же группы.

Анализ плотности нейронов. Данные по плотности нейронов в СА1 области гиппокампа представлены на рис. 1. Многофакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния “типа развития”, “пола” и взаимодействия между этими факторами на данный параметр ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение выявило лишь тенденцию ($p = 0.075$) к уменьшению числа нейронов в СА1 области гиппокампа у самок ET-C57BL по сравнению с особями группы C57BL того же пола ($0.65 \times 10^6 \pm 0.05 \times 10^6$ против $0.94 \times 10^6 \pm 0.07 \times 10^6$).

Данные по плотности нейронов в СА2 представлены на рис. 2а–д. Многофакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния “типа развития”, “пола” и взаимодействия между этими факторами на данный параметр ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение также не выявило различий.

Данные по плотности нейронов в СА3 представлены на рис. 2ж–л. Многофакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния “типа развития”, “пола” и взаимодействия между этими факторами на данный параметр ($p > 0.05$). Однако апостериорное сравнение выявило уменьшение числа нейронов ($p < 0.05$) в СА3 области гиппокампа у самок ET-C57BL по сравнению с самками группы C57BL ($3.36 \times 10^5 \pm 0.11 \times 10^5$ против $4.85 \times 10^5 \pm 0.49 \times 10^5$).

Данные по плотности нейронов в DG представлены на рис. 3а–д. Многофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние “пола” ($F_{1,15} = 4.84$, $p < 0.05$) на этот показатель. Однако значимого влияния “типа развития” и взаимодействия “типа развития” и “пола” выявлено не было ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение частично подтвердило влияние пола, показав тенденцию ($p = 0.062$) к уменьшению числа нейронов в DG области гиппокампа у самок ET-C57BL по сравнению с самцами той же группы ($1.27 \times 10^6 \pm 0.06 \times 10^6$ против $1.50 \times 10^6 \pm 0.04 \times 10^6$).

Данные по нейрогенезу в DG области гиппокампа представлены на рис. 3ж–л. Многофакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние “типа развития” ($F_{1,14} = 18.66$; $p < 0.001$) на этот показатель. Однако значимого влияния “пола” и взаимодействия “типа развития” и “пола” выявлено не было ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение подтвердило достоверную разницу по уровню нейрогенеза в субгранулярной зоне DG области гиппокампа между группами. В этой зоне у самцов ($p < 0.05$) и самок ($p < 0.01$) группы ET-C57BL было достоверно меньше DCX-позитивных нейронов по сравнению с контролями того же пола ($0.74 \times 10^4 \pm 0.22 \times 10^4$ против $2.01 \times 10^4 \pm 0.66 \times 10^4$ для самцов; $0.60 \times 10^4 \pm 0.11 \times 10^4$ против $1.65 \times 10^4 \pm 0.42 \times 10^4$ для самок).

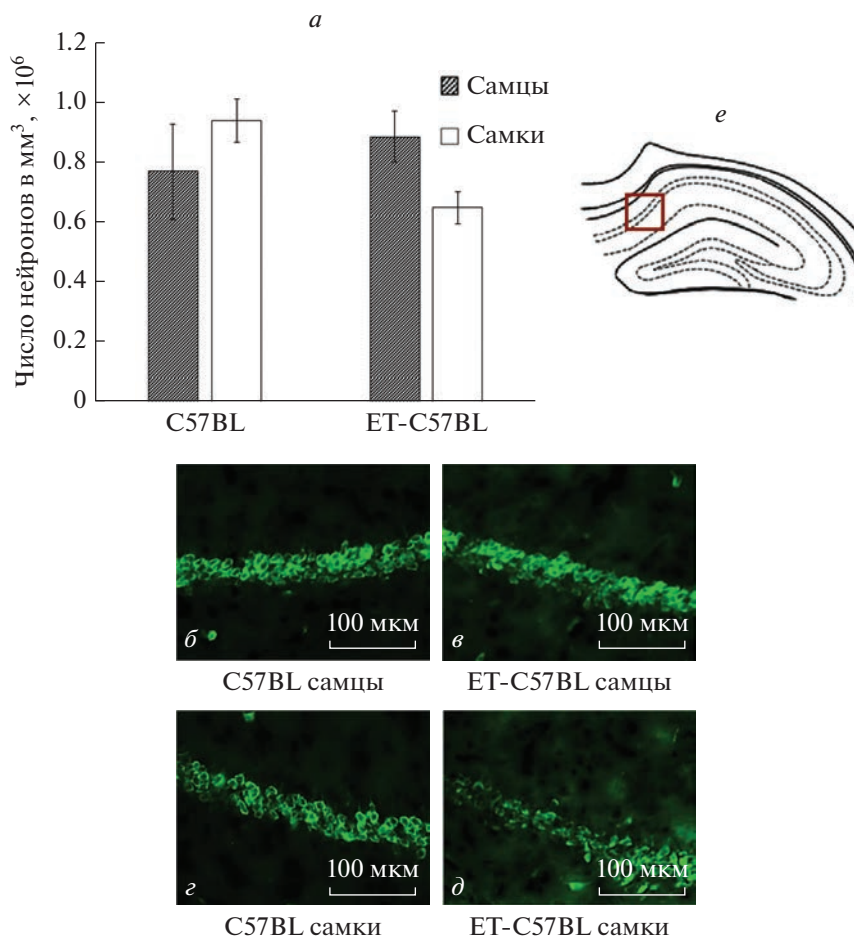


Рис. 1. Число меченых против NeuN пирамидных нейронов в CA1 области гиппокампа у потомков C57BL и ET-C57BL. *a* – число нейронов на мм³; *б–д* – репрезентативные срезы: *б* – у самцов группы C57BL, *в* – у самцов группы ET-C57BL, *з* – у самок группы C57BL, *д* – у самок группы ET-C57BL, *е* – схематическое представление анализируемой области.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство исследований на людях показали, что ЭКО в сочетании с переносом эмбрионов не влияло на нормальное постнатальное развитие детей, зачатых с помощью ВРТ [6, 34]. В одной работе была выявлена положительная связь между зачатием с помощью ВРТ и когнитивными способностями детей в возрасте трех и пяти лет [35]. Однако, согласно недавнему обзору [3], возможно и негативное влияние ВРТ на когнитивные способности детей, хотя если анализировать лишь детей, рожденных в результате одноплодной беременности, статистическая значимость исчезает. Данные клинических отчетов предполагают, что изменения в развитии детей, зачатых с помощью ВРТ, могут быть связаны с использованием различных сред для культивирования эмбрионов *in vitro*, что делает выборки более гетерогенными и усложняет анализ [36, 37].

Работа, выполненная на лабораторных мышах, подтверждает эти выводы медицинской литературы и позволяет предположить, что различия в экспрессии генов на стадии бластоцисты могут быть связаны с культивированием *in vitro* либо в простой среде, либо в среде, обогащенной различными ингредиентами [18]. Однако другое исследование на мышах указывает на то, что эффекты культуральной среды могут не сохраняться после имплантации [38].

Было продемонстрировано, что KSOM, который мы использовали в данном исследовании, является оптимальной средой для культивирования эмбрионов *in vitro* у нескольких видов животных [39]. Взрослые потомки мужского пола обеих исследуемых групп имели большую массу тела по сравнению с самками; соотношение мозга к телу было ниже у первых, чем у вторых. Этот результат хорошо согласуется с недавним сообщением о том, что, начиная с пятой недели постнатального развития, самцы C57BL/6J тяжелее самок [40], и их

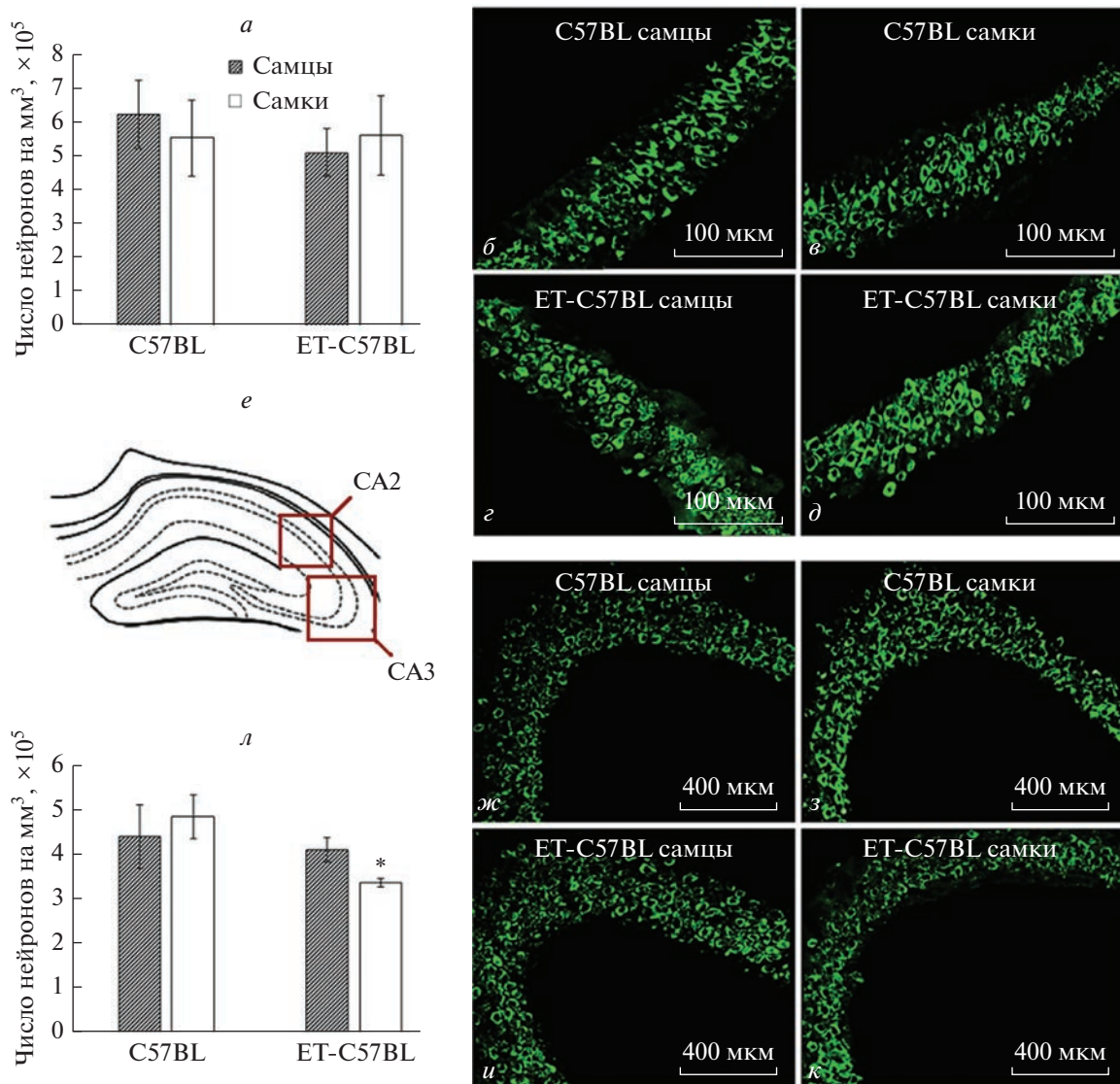


Рис. 2. Число меченых против NeuN пирамидных нейронов в CA2 и CA3 областях гиппокампа у потомков C57BL и ET-C57BL. *a* – число нейронов на мм³ в области CA2; *б–д* – репрезентативные срезы в области CA2: *б* – у самцов группы C57BL; *в* – у самок группы C57BL; *з* – у самцов группы ET-C57BL; *д* – у самок группы ET-C57BL; *e* – схематическое представление анализируемых областей; *ж–к* – репрезентативные срезы в области CA3: *ж* – у самцов группы C57BL; *з* – у самок группы C57BL; *и* – у самцов группы ET-C57BL; *к* – у самок группы ET-C57BL; *л* – число нейронов на мм³ в области CA3. Различия между самками C57BL и ET-C57BL групп: * $p < 0.05$.

соотношение мозга к телу ниже [41]. Отсутствие различий в данных параметрах между потомками, родившимися после применения ВРТ и естественно рожденными согласуется с выводами другой работы на мышах в которой было показано, что культивирование *in vitro* на разных культуральных средах и перенос эмбрионов не приводят к существенным отклонениям в общем развитии по сравнению с контролем [38].

Существует лишь несколько исследований, посвященных особенностям мозга детей, зачатых с помощью ВРТ, но единого мнения по данному вопросу на сегодняшний день нет [42–44]. Пока-

зано, что размер некоторых отделов головного мозга у детей, зачатых с помощью ВРТ, увеличивается к 11-й неделе гестационного срока [44]. Риск повреждения белого вещества в возрасте двух лет у недоношенных детей, зачатых с помощью ВРТ, был выше по сравнению с недоношенными детьми, зачатыми естественным путем [43]. Однако в другом исследовании было показано, что дети в возрасте двух лет, родившиеся после ВРТ, имели сходную моторику, уровень когнитивных способностей и развитие речи, как и дети, родившиеся после естественного зачатия [42]. В настоящее время не существует исследований на людях, которые

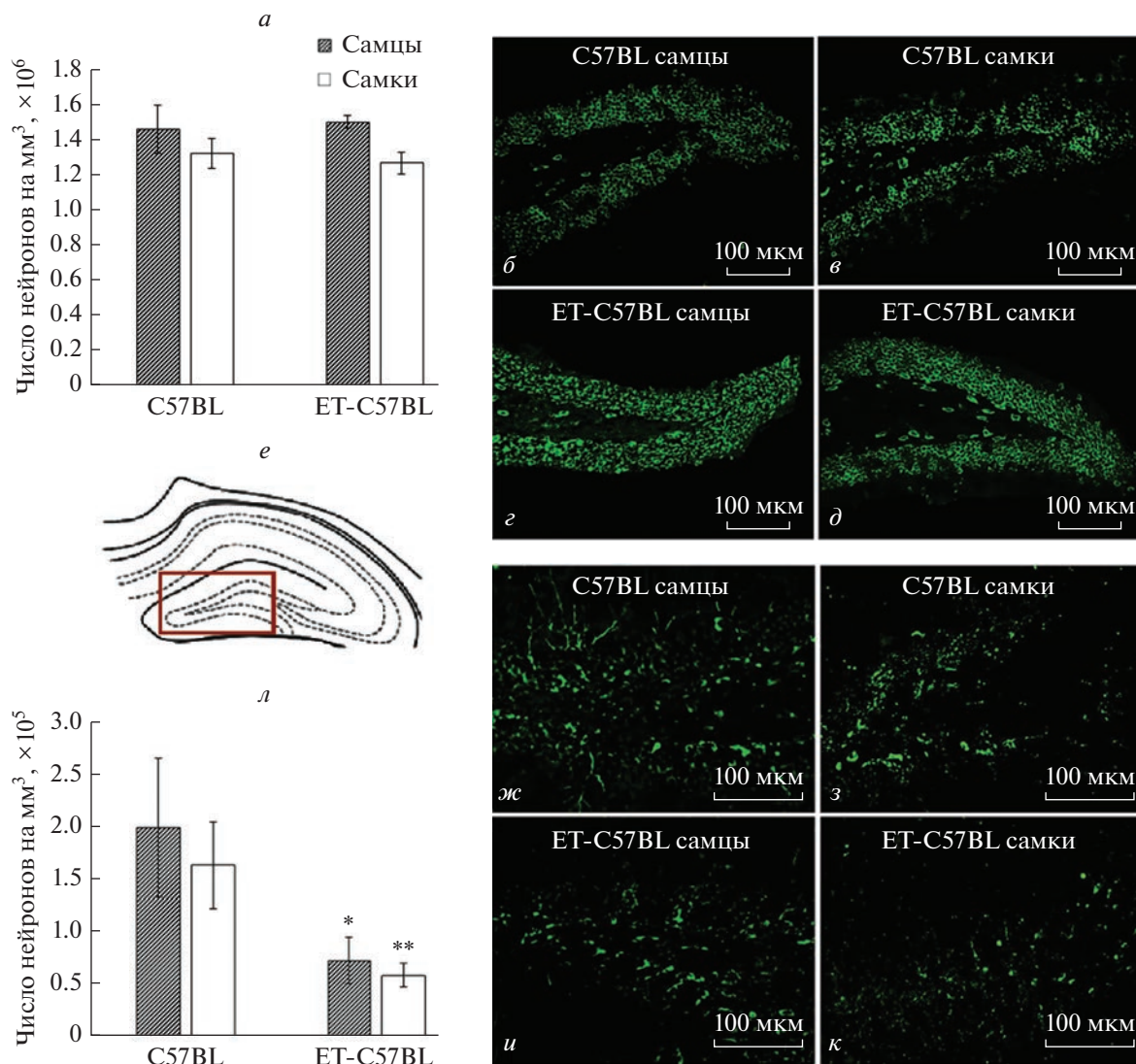


Рис. 3. Число меченых против NeuN пирамидных нейронов и нейрогенез в DG области гиппокампа у потомков C57BL и ET-C57BL. *а* – число нейронов на мм^3 ; *б–д* – репрезентативные срезы в области DG: *б* – у самцов группы C57BL; *в* – у самок группы C57BL; *г* – у самцов группы ET-C57BL; *д* – у самок группы ET-C57BL; *е* – схематическое представление анализируемой области; *ж–к* – репрезентативные срезы субгранулярной зоны DG иллюстрирующие уровень нейрогенеза: *ж* – у самцов группы C57BL; *з* – у самок группы C57BL; *и* – у самцов группы ET-C57BL; *к* – у самок группы ET-C57BL; *л* – число меченых против DCX нейронов на мм^3 в субгранулярной зоне DG. Различия между C57BL и ET-C57BL группами одного пола: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

рассматривают долгосрочные эффекты культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов на развитие гиппокампа.

В нашем исследовании была выявлена тенденция к уменьшению числа нейронов в области CA1 у самок группы ET-C57BL по сравнению с контролем и в зубчатой извилине по сравнению с самцами той же группы. Кроме того, было обнаружено меньше пирамидных нейронов в CA3 зоне гиппокампа у самок группы ET-C57BL. Ранее у мышей линии C57BL/6N, рожденных после переноса эмбрионов, наблюдали изменения эмоционального поведения, причем только у самок [24].

Уменьшение плотности нейронов может быть связано с нарушением процесса нейрогенеза, который играет существенную роль при возникновении психических расстройств у человека [45]. Наше исследование показывает, что у мышей группы ET-C57BL, рожденных с применением ВРТ, уровень нейрогенеза в субгранулярной зоне DG гиппокампа был, действительно, существенно снижен.

Различия по плотности нейронов между самцами и самками могут быть связаны с разным уровнем транскрипции многих генов у преимплантационных эмбрионов мышей разного пола [46, 47]. На этапе раннего развития эмбриона

имеются эпигенетические различия между полами, в частности, эмбрионы мышей разного пола отличаются как по скорости развития, так и некоторым метаболическим особенностям, что, в частности, может быть одной из причин обнаруженных различий по плотности нейронов у потомков разного пола, рожденных после культивирования эмбрионов *in vitro* и последующего их переноса [48–51].

В более ранних исследованиях было изучено влияние ВРТ на различные структуры головного мозга у мышей и крыс [52–55]. В исследованиях на мышцах было показано, что индуцирование суперовуляции помощью ГСЖК и ХГЧ у самок-доноров эмбрионов в сочетании с эмбриотрансфером приводит к изменению экспрессии генов, участвующих в развитии нервной системы [52]. Другое исследование на мышцах показало, что ЭКО в сочетании с переносом эмбрионов вызывает изменения в экспрессии генов и синтезе белков, а также влияет на уровень метилирования ДНК в головном мозге [53]. Обнаруженные в этих работах изменения в мозге потомков могут быть связаны с применением различных репродуктивных технологий в их разных сочетаниях. Между тем, насколько нам известно, нет опубликованных работ, посвященных влиянию культивирования *in vitro* в сочетании с суперовуляцией и переносом эмбрионов (без применения ЭКО) на плотность нейронов и нейрогенез в головном мозге у потомства.

Имеются данные на мышцах, указывающие на значительные изменения в паттерне экспрессии генов, связанные с культивированием *in vitro* преимплантационных эмбрионов [56]. Кроме того, исследования на мышцах показали значительное влияние линии мышей на экспрессию генов в плаценте после применения культивирования *in vitro* [56]. Кроме того, обнаружено, что в головном мозге мышей, рожденных после ЭКО, отмечается снижение синтеза некоторых белков, в частности, *Tuba1c*, *Crk* и *Psmα3*, что, как полагают авторы, связано с эпигенетическими нарушениями [57]. Также у самцов мышей, полученных в результате ЭКО, последующего краткосрочного культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов, выявлено снижение некоторых нейротрофинов (BDNF, GDNF и NGF) в гиппокампе [58]. В наших более ранних исследованиях на крысах было показано снижение уровня BDNF в гиппокампе после некоторых процедур, связанных с ВРТ [55]. Можно предположить, что процедуры ВРТ, в частности, культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов, могут приводить к более низкому уровню нейротропных факторов в некоторых областях мозга, что приводит к наблюдаемому в нашем исследовании снижению плотности пирамидных нейронов в некоторых областях гиппокампа у потомков, полученных после применения этих процедур ВРТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов не оказывают существенного влияния на массу тела и мозга у потомства, но влияют на нейрогенез в субгранулярной зоне зубчатой извилины у взрослых потомков обоих полов, а также на плотность нейронов в СА3 области гиппокампа у самок.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РНФ № 23-25-00123. Содержание животных осуществляли благодаря бюджетному проекту № FWNР-2022-0023 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Содержание экспериментальных животных и все процедуры выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eight Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council © 2011 National Academy of Sciences (США). Работа с животными регламентирована следующими документами: “Правила надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.; межгосударственными стандартами ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными” (Правила оборудования помещений и организации процедур, дата введения 2015-07-01). Условия содержания животных и проведенные эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berntsen S., Soderstrom-Anttila V., Wennerholm U.-B., Laivuori H., Loft A., Oldereid N.B., Romundstad L.B., Bergh C., Pinborg A. // Hum. Reprod. Update. 2019. V. 25. P. 137–158.
2. Ramos-Ibeas P., Heras S., Gomez-Redondo I., Planells B., Fernandez-Gonzalez R., Pericuesta E., Laguna-Barraza R., Perez-Cerezales S., Gutierrez-Adan A. // Mol. Reprod. Dev. 2019. V. 86. P. 1292–1306.
3. Bergh C., Wennerholm U.B. // Ups. J. Med. Sci. 2020. V. 125. P. 152–157.
4. Scherrer U., Rexhaj E., Allemann Y., Sartori C., Rimoldi S.F. // Eur. Heart. J. 2015. V. 36. P. 1583–1589.

5. Meister T.A., Rimoldi S.F., Soria R., von Arx R., Messerli F.H., Sartori C., Scherrer U., Rexhaj E. // J. Am. Coll. Cardiol. 2018. V. 72. P. 1267–1274.
6. Rumbold A.R., Moore V.M., Whitrow M.J., Oswald T.K., Moran L.J., Fernandez R.C., Barnhart K.T., Davies M.J. // Hum. Reprod. 2017. V. 32. P. 1489–1507.
7. La Rovere M., Franzago M., Stuppia L. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 4169.
8. Pontesilli M., Painter R.C., Grooten I.J., van der Post J.A., Mol B.W., Vrijkotte T.G., Repping S., Roseboom T.J. // Reprod. Biomed. Online. 2015. V. 30. P. 258–267.
9. Gleicher N., Kushnir V.A., Barad D.H. // Reprod. Biol. Endocrinol. 2014. V. 12. P. 22.
10. Dayan N., Lanes A., Walker M.C., Spitzer K.A., Laskin C.A. // Fertil. Steril. 2016. V. 105. P. 1003–1009.
11. Barker D.J.P. // J. Int. Med. 2007. V. 261. P. 412–417.
12. Fleming T.P., Velazquez M.A., Eckert J.J. // J. Dev. Orig. Health. Dis. 2015. V. 6. P. 377–383.
13. Li X., Zhang M., Pan X., Xu Z., Sun M. // Birth. Defects. Res. 2017. V. 109. P. 744–757.
14. Sandin S., Nygren K.G., Iliadou A., Hultman C.M., Reichenberg A. // JAMA. 2013. V. 310. P. 75–84.
15. Kissin D.M., Zhang Y., Boulet S.L., Fountain C., Bearman P., Schieve L., Yeargin-Allsopp M., Jamieson D.J. // Hum. Reprod. 2015. V. 30. P. 454–465.
16. Liu L., Gao J., He X., Cai Y., Wang L., Fan X. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 46207.
17. Andreadou M.T., Katsaras G.N., Talimtzis P., Doxani C., Zintzaras E., Stefanidis I. // Eur. J. Pediatr. 2021. V. 180. P. 2741–2755.
18. Sunde A. // In Vitro Fertilization. 2019. P. 877–889.
19. Watkins A.J., Platt D., Papenbrock T., Wilkins A., Eckert J.J., Kwong W.Y., Osmond C., Hanson M., Fleming T.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2007. V. 104. P. 5449–5454.
20. Rexhaj E., Paoloni-Giacobino A., Rimoldi S.F., Fuster D.G., Anderegg M., Somm E., Bouillet E., Allemann Y., Sartori C., Scherrer U. // J. Clin. Invest. 2013. V. 27. P. 5052–5060.
21. Ecker D.J., Stein P., Xu Z., Williams C.J., Kopf G.S., Bilker W.B., Abel T., Schultz R.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 1595–1600.
22. Rose C., Schwegler H., Hanke J., Rohl F.W., Yilmazer-Hanke D.M. // Behav. Brain. Res. 2006. V. 173. P. 163–168.
23. Lopez-Cardona A.P., Fernandez-Gonzalez R., Perez-Crespo M., Alen F., de Fonseca F.R., Orio L., Gutierrez-Adan A. // Biol. Reprod. 2015. V. 93. P. 85.
24. Lerch S., Tolksdorf G., Schutz P., Brandwein C., Dormann C., Gass P., Chourbaji S. // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2016. V. 55. P. 510–519.
25. Duranthon V., Chavatte-Palmer P. // Mol. Reprod. Dev. 2018. V. 85. P. 348–368.
26. Igonina T.N., Ragaeva D.S., Petrova O.M., Rozkova I.N., Brusentsev E.Y., Amstislavsky S.Y. // Hypertens. Pregnancy. 2019. V. 38. P. 208–216.
27. Auroux M., Cerutti I., Ducot B., Loeuillet A. // Reprod. Toxicol. 2004. V. 18. P. 813–818.
28. Klemetti R., Sevon T., Gissler M., Hemminki E. // Pediatrics. 2006. V. 118. P. 1819–1827.
29. Kallen A.J., Finnstrom O.O., Lindam A.P., Nilsson E.M.E., Nygren K-G., Otterblad Olausson P.M. // Eur. J. Paediatr. Neurol. 2010. V. 14. P. 526–530.
30. Bauman M.L., Kemper T.L. // Int. J. Dev. Neurosci. 2005. V. 23. P. 183–187.
31. Courchesne E., Pierce K. // Int. J. Dev. Neurosci. 2005. V. 23. P. 153–170.
32. Varghese M., Keshav N., Jacot-Descombes S., Warda T., Wicinski B., Dickstein D.L., Harony-Nicolas H., De Rubeis S., Drapeau E., Buxbaum J.D., Hof P.R. // Acta. Neuropathol. 2017. V. 134. P. 537–566.
33. Paxinos G., Franklin K. // Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th ed., Academic Press, 2012.
34. Mintjens S., Menting M.D., Gemke R.J.B.J., van Poppe M.N.M., van Wely M., Bendsdorp A.J., Tjon Kon Fat R.I., Mol B.W.J., Painter R.C., van de Beek C., Roseboom T.J. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2019. V. 242. P. 131–138.
35. Barbascia A., Mills M.C. // Hum. Reprod. 2017. V. 32. P. 1482–1488.
36. Bouillon C., Leandri R., Desch L., Ernst A., Bruno C., Cerf C., Chiron A., Souhay C., Burguet A., Jimenez C., Sagot P., Fauque P. // PLoS One. 2016. V. 11. e0150857.
37. Zandstra H., Smits L.J.M., van Kuijk S.M.J., van Golde R.J.T., Evers J.L.H., Dumoulin J.C.M., van Montfoort A.P.A. // Hum. Reprod. Open. 2018. V. 2018. hoy018.
38. Hemkemeyer S.A., Schwarzer C., Boiani M., Ehmcke J., Le Gac S., Schlatt S., Nordhoff V. // Hum. Reprod. 2014. V. 29. P. 220–233.
39. Раннева С.В., Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рагаева Д.С., Рожкова И.Н., Еришов Н.И., Левинсон А.Л., Амстиславский С.Я. // Онтогенез. 2020. Т. 51. С. 417–439.
40. Rathod Y.D., Di Fulvio M. // PLoS One. 2021. V. 16. e0246569.
41. Fairless A.H., Dow H.C., Kreibich A.S., Torre M., Kuruvilla M., Gordon E., Morton E.A., Tan J., Berrettini W.H., Li H., Abel T., Brodtkin E.S. // Behav. Brain. Res. 2012. V. 228. P. 299–310.
42. Balayla J., Sheehy O., Fraser W.D., Seguin J.R., Trasler J., Monnier P., MacLeod A.A., Simard M.N., Muckle G., Berard A. // Obstet. Gynecol. 2017. V. 129. P. 265–272.
43. Huang X., Fu J. // Front. Pediatr. 2021. V. 9. P. 686670.
44. Husen S.C., Koning I.V., Go A.T.J.I., Groenenberg I.A.L., Willemsen S.P., Rousian M., Steegers-Theunissen R.P.M. // Hum. Reprod. 2021. V. 36. P. 596–604.
45. Schoenfeld T.J., Cameron H.A. // Neuropsychopharmacology. 2015. V. 40. P. 113–128.
46. Peaston A.E., Evisikov A.V., Graber J.H., de Vries W.N., Holbrook A.E., Solter D., Knowles B.B. // Dev. Cell. 2004. V. 7. P. 597–606.
47. Fernandez-Gonzalez R., Ramirez M.A., Pericuesta E., Calle A., Gutierrez-Adan A. // Biol. Reprod. 2010. V. 83. P. 720–727.
48. Peippo J., Bredbacka P. // Mol. Reprod. Dev. 1995. V. 40. P. 56–61.
49. Perez-Crespo M., Ramirez M.A., Fernandez-Gonzalez R., Rizo D., Lonergan P., Pintado B., Gutierrez-Adan A. // Mol. Reprod. Dev. 2005. V. 72. P. 502–510.

50. Gutierrez-Adan A., Perez-Crespo M., Fernandez-Gonzalez R., Ramirez M.A., Moreira P., Pintado B., Lonergan P., Rizzo D. // *Reprod. Domest. Anim.* 2006. V. 41. P. 54–62.
51. Bermejo-Alvarez P., Rizzo D., Lonergan P., Gutierrez-Adan A. // *Reproduction*. 2011. V. 141. P. 563–570.
52. Mainigi M., Rosenzweig J.M., Lei J., Mensah V., Thomaier L., Talbot Jr C.C., Olalere D., Ord T., Rozzah R., Johnston M.V., Burd I. // *Reprod. Sci.* 2016. V. 23. P. 785–794.
53. Hu M., Lou Y., Liu S., Mao Y., Le F., Wang L., Li L., Wang Q., Li H., Lou H., Wang N., Jin F. // *Mol. Hum. Reprod.* 2020. V. 26. P. 141–153.
54. Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рагаева Д.С., Петрова О.М., Напримов В.А., Тихонова М.А., Амстиславская Т.Г., Амстиславский С.Я. // *Журнал высшей нервной деятельности*. 2019. Т. 69. С. 618–628.
55. Rozhkova I., Brusentsev E., Igonina T., Ragaeva D., Petrova O., Tikhonova M.A., Akopyan A.A., Amstislavskaya T.G., Antonov Y.V., Amstislavsky S. // *Hypertens. Pregnancy*. 2020. V. 39. P. 283–294.
56. de Waal E., Mak W., Calhoun S., Stein P., Ord T., Krapp C., Coutifaris C., Schultz R.M., Bartolomei M.S. // *Biol. Reprod.* 2014. V. 90. P. 22.
57. Zhu W., Zheng J., Wen Y., Li Y., Zhou C., Wang Z. // *Gynecol. Endocrinol.* 2020. V. 36. P. 973–977.
58. Qin N.X., Zhao Y.R., Shi W.H., Zhou Z.Y., Zou K.X., Yu C.J., Liu X., Dong Z.H., Mao Y.T., Zhou C.L., Yu J.L., Liu X.M., Sheng J.Z., Ding G.L., Zhao W.L., Wu Y.T., Huang H.F. // *Reproduction*. 2021. V. 162. P. 437–448.

Effect of *In Vitro* Culture and Embryo Transfer on Neuronal Density and Neurogenesis in the Brain of C57BL/6J Mice

E. Yu. Brusentsev^a, T. N. Igonina^a, I. N. Rozhkova^a, S. V. Okotrub^a, D. A. Lebedeva^{a, b},
E. V. Vladimirova^a, V. S. Kozenova^{a, b}, and S. Ya. Amstislavsky^a

^a Institute of Cytology and Genetics (ICG), Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

^b Novosibirsk State University (NSU), Novosibirsk, Russia

The current research is aimed to determine the long-term effects of the *in vitro* culture (IVC) and embryo transfer (ET) on the neonatal offspring development, as well as on the adult hippocampal neuronal densities, as well hippocampal neurogenesis in C57BL/6J mice. Offspring of naturally born C57BL/6J mice (C57BL group) were compared with C57BL/6J mice born as a result of the IVC combined with ET to C57BL/6J recipient females (ET-C57BL group). At age of 3 mo., no group differences were observed in the body weight and brain-to-body ratio, although sex differences in these variables were observed. The offspring of both sexes born after IVC-ET exhibited the lower level of neurogenesis in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus as compared to the control C57BL group. To conclude, IVC and ET exerted no major effects on body and brain weight in offspring, but affected hippocampal neurogenesis in the adult offspring of both sexes. Besides, the number of pyramidal neurons in the CA3 area of hippocampus was lower in female offspring of ET-C57BL group.

Keywords: C57BL/6J, preimplantation embryos, *in vitro* culture, neuronal density, hippocampus, neurogenesis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.25

ДЛИТЕЛЬНЫЙ ОПЫТ АГРЕССИИ ИЗМЕНЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В ГИПОТАЛАМУСЕ САМЦОВ МЫШЕЙ ДВУХ ЛИНИЙ

© 2023 г. А. А. Сапронова^{1, *}, П. Э. Кисаретова^{1, 2}, Р. Салман^{1, 2}, Н. П. Бондарь^{1, 2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный исследовательский университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 06.03.2023 г.

Принята к публикации 07.03.2023 г.

Повторный опыт агрессии может приводить к изменению нейрофизиологии и поведения животных и к формированию паталогической агрессии. Важную роль в механизмах адаптации к повторной агрессии играет гипоталамус и активируемая им ГГНС-ось. В данной работе исследовали влияние длительного (30 дней) опыта агрессии на экспрессию генов в гипоталамусе у самцов мышей двух линий — C57BL/6J и CD1. Мы оценили уровень экспрессии генов ГГНС-оси (*Crh*, *Crhr1*, *Crhbp*, *Fkbp5*, *Nr3c1*), гена раннего ответа *Fos* и гена D1 рецептора дофамина *Drd1*. Длительный опыт агрессии привел к более продолжительной активации *Fos* у самцов линии C57BL/6J, хотя экспрессия других исследованных генов практически не изменилась. Агрессоры линии CD1 характеризуются снижением уровня экспрессии генов *Crhr1* и *Crhbp*, продукты которых ингибируют секрецию кортикотропин-рилизинг гормона. Для большинства исследованных генов показаны межлинейные различия в уровне экспрессии, которые, вероятно, связаны с разным уровнем двигательной активности и тревожности мышей данных линий. Базальный уровень экспрессии гена *Crh* был выше у мышей линии C57BL/6J, а генов *Crhr1*, *Crhbp*, *Fkbp5*, *Fos* и *Drd1* — у мышей линии CD1. Таким образом, повторный опыт агрессии приводит к изменению уровня экспрессии генов в гипоталамусе самцов мышей в зависимости от генетических особенностей линии и связанных с этим психофизиологических характеристик особей.

Ключевые слова: повторный опыт агрессии, гипоталамус, ГГНС, мыши линии CD1, мыши линии C57BL/6J

DOI: 10.31857/S1027813323030160, **EDN:** YVELFX

ВВЕДЕНИЕ

Агрессивное поведение — это нападение или угроза нападения на особей своего же вида [1, 2]. Она может быть реактивной или проактивной, нормальной или патологической, преднамеренной или импульсивной [3, 4]. Предварительный опыт агрессии усиливает вероятность победы в последующих агонистических столкновениях. Подобный эффект, который еще называют “эффектом победителя” (winner effect) [5], был показан у разных видов животных [6, 7]. Дальнейшее приобретение опыта агрессии приводит к значительным изменениям в поведении, физиологии и нейрохимии животных [8–10]. Было показано, что повторный опыт агрессии приводит к повышению уровня тестостерона [7, 11], кортикостерона [12], а также к повышению уровня тревожности у самцов мышей [13]. Кроме того, длительный опыт

агрессии приводит к активации дофаминергической системы головного мозга [14, 15]. У части животных длительный опыт агрессии может приводить к патологическим формам агрессии — например, нанесении увечий уже подчинившемуся самцу, согласному со своей ролью в иерархии или агрессии самцов против самок своего вида и детенышей [16, 17].

Была выдвинута гипотеза [18], что зависимость агрессивности от реактивности ГГНС-оси имеет U-образный вид, то есть низкая агрессивность коррелирует со средним уровнем реактивности ГГНС-оси, а при аномально низкой или высокой реактивности ГГНС агрессия будет повышена. Так, было показано, что у трех линий мышей, селективированных на повышенную агрессивность (SAL, NC900, TA), реактивность ГГНС-оси была понижена [19, 20]. А линии крыс с контрастным уровнем активности ГГНС и контрастным уровнем тревожности имели одинаково высокий уровень агрессивности [21, 22], что подтверждает выдвинутую гипотезу.

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр-т Ак. Лаврентьева, 10; e-mail: sapronovann@gmail.com.

Одним из центров контроля поведения, в котором сходятся нейронные пути, обрабатывающие внешние и внутренние сигналы, является гипоталамус [23]. В гипоталамусе находится один из центров принятия решения об атаке [24, 25], и одновременно гипоталамус является ключевым звеном в развитии гормональной стрессовой реакции [26].

Как активность ГГНС, так и проявление спонтанной агрессивности контролируются генетическими факторами, в связи с этим хорошо показаны межлинейные различия в агрессивности мышей [27, 28]. Показано что для мышей линии CD1 характерна высокая агрессивность относительно C57BL [29, 30]. Однако мыши линии CD1 более устойчивы к стрессу и демонстрируют сравнительно низкую тревожность в приподнятом крестообразном лабиринте по сравнению с мышами других линий [29, 31], и длительный опыт агрессии не приводит у них к повышению уровня тревожности, в отличие от мышей линии C57BL [32].

Целью нашей работы было оценить влияние длительного опыта агрессии на экспрессию генов гипоталамуса у линий мышей, отличающихся по тревожности и агрессивности (инбредная линия C57BL и аутбредная линия CD1). Для исследования нами были выбраны гены ГГНС-оси: ген кортикотропин-рилизинг гормона (КРГ) *Crh*, ген рецептора КРГ *Crhr1*, ген белка, связывающего КРГ *Crhbp*, гены глюкокортикоидного рецептора (ГР) *Nr3c1* и его ко-шаперона *Fkbp5*. Рецептор CRHR1 в гипоталамусе является частью петли обратной связи ГГНС, а белок CRHBP связывает КРГ, уменьшая количество КРГ, поступающее в гипофиз для активации ГГНС. Глюкокортикоидный рецептор в гипоталамусе, реагирующий на кортикостерон, необходим для окончания стрессовой реакции, а ко-шаперон FKBP51 снижает чувствительность ГР к стимуляции гормоном, увеличивая тем самым продолжительность стрессовой реакции. Также мы оценили экспрессию гена раннего ответа *Fos*, продукт которого является транскрипционным фактором, и экспрессия которого коррелирует с общей активностью экспрессии генов в нейронах, и экспрессию гена D1 рецептора дофамина *Drd1*, наиболее распространенного рецептора дофамина в мозге, так как дофамин связан с нейронным контуром агрессии

МЕТОДЫ

Животные. Эксперименты проводили на самцах мышей линий C57BL/6J и CD1 в возрасте 2,5–3 мес. Мыши содержались в стандартных условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI62119X0023) (12:12 ч света/темноты, рассвет в 19:00, вода и корм *ad libitum*). После отсаживания от матерей в возрасте 1 мес. мышей

содержали в группах по 8–10 особей в клетках 36 × 23 × 12 см до использования в эксперименте.

Формирование агрессивного типа поведения у самцов мышей. Для формирования агрессивного типа поведения у самцов мышей использовали модель сенсорного контакта [33]. Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволявшей мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга, но предотвращавшей физическое взаимодействие. В течение 30 дней ежедневно во второй половине дня (15.00–17.00 ч) убрали перегородку на 10 мин, что приводило к межсамцовым конфронтациям. При проведении первых 2–3 дней тестов выявляли победителей (агрессоров), и особей, терпящих поражения (“жертв”) при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем к агрессору подсаживали незнакомую “жертву”. Взаимодействие самцов прекращали, если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время агрессивных столкновений длились более 2 мин, вновь устанавливая между ними перегородку. В качестве жертв использовались самцы линии C57BL/6J.

В качестве контроля использовали животных без опыта агрессивных взаимодействий, рассаживаемых в индивидуальные клетки за 5 дней до взятия материала. Контрольные мыши не подвергались никаким тестированиям. В группах было по 9–11 животных.

Анализ агрессивного поведения. Исследование поведения проводилось в экспериментальной клетке, где предварительно животные получали опыт агонистических столкновений. Из клетки убрали перегородку, разделяющую мышей, и у агрессивных самцов за 3 мин теста регистрировали следующие формы поведения: 1. прямая агрессия (атаки, укусы и преследование партнера); 2. агрессивный груминг: покусывание морды, загрызание или сплины побежденного партнера в течение продолжительного времени; побежденное животное при этом замирает и не сопротивляется; 3. неагрессивный контакт с партнером (обнюхивание, касание тела лапами); 4. нахождение в непосредственной близости от партнера (не более 2 см); 5. разбрасывание чужой подстилки на территории партнера (нарушение его гнезда и туалетного места); 6. вставание на задние лапы, отражает вертикальную двигательную активность и исследовательское поведение; 7. чистка тела — действия, направленные на поддержание чистоты тела (умывание, почесывание); 8. вращение: быстрый резкий поворот на 180°; 9. враждебное поведение — сумма общего времени атак, агрессивного груминга и разбрасывания чужой подстилки, то есть поведения в той или иной мере наносящего вред партнеру; 10. суммарное время контакта с партнером — сумма общего времени, проведенного в контакте с

партнером (атаки, агрессивный груминг, неагрессивный контакт с партнером).

Для каждой формы поведения фиксировали латентное время первого действия; общее время действия; число действий. Если животное не демонстрировало какое-либо поведение, то латентное время считалось равным 180 с (длительность теста) и все остальные параметры приравнивались к нулю.

Сбор тканей. На следующий день после последней агонистической конфронтации между 10 и 13 ч утра животные были забиты быстрой декапитацией, после чего были выделены и взвешены надпочечники. Для выделения гипоталамуса мозг целиком извлекали из черепной коробки, переворачивали на дорзальную сторону и с помощью лопатки и скальпеля отделяли гипоталамус, который визуально и структурно отличается от других тканей мозга. Далее гипоталамус помещали в пробирку и замораживали при -70°C .

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени. Из замороженных образцов ткани в дальнейшем выделяли РНК с использованием PureZOL RNA Isolation Reagent (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя. Образцы были обработаны ДНКазой DNase I (Thermo Fisher Scientific, США) и затем очищены с помощью парамагнитных частиц RNeasy Clean XP beads (Beckman Coulter, США). Измерение качества и количества выделенной РНК проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000. Для синтеза комплементарной ДНК использовали набор RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) со случайными гексаолигонуклеотидами, для ПЦР использовали наборы Био-Мастер HS-qПЦР (BioLabMix, Россия). В реакцию брали 0.5 мкг РНК, все процедуры проводили согласно протоколам производителя.

Для оценки экспрессии генов использовали ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов. Мы оценили экспрессию генов *Crh*, *Crhr1*, *Crhbp*, *Fkbp5*, *Nr3c1*, *Drd1*, *Fos*. Праймеры и зонды для каждого гена подбирали с использованием программы Primer-BLAST (NCBI). Последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1. Результаты по каждому целевому гену нормализовали на геометрическое среднее относительного количества референсных генов *Hk1* и *Gpm6b* и анализировали с помощью $\Delta\Delta\text{Ct}$ метода с использованием программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad, США). Каждую реакцию проводили в двух повторах. Поскольку для референсных и таргетных генов использовали зонды с разными флуорофорами (*Hk1* – Cy5, *Gpm6b* – HEX, таргетные гены – ROX), то измерение экспрессии таргетных и референсных генов проводили в одной лунке. Эффективность амплификации каждой пары праймеров составляла от 80 до 110%. Стабильность референсных генов между и внутри

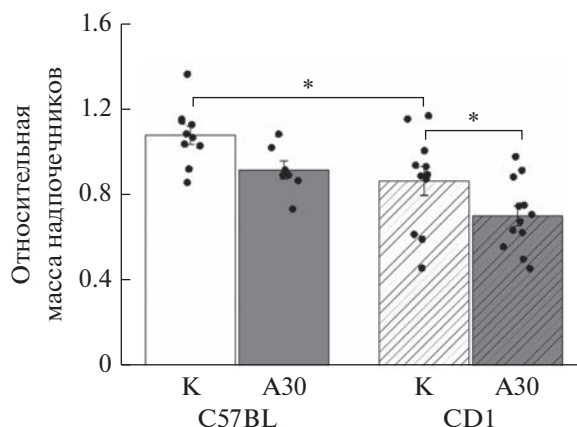


Рис. 1. Относительная масса надпочечников. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Двухфакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с использованием критерия Fisher's LSD, * $p < 0.05$. К – контрольная группа, A30 – мыши с опытом агрессии в течение 30 дней.

групп проверяли с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, США): стабильность экспрессии (M) была менее 0.5 и коэффициент вариации (CV) был менее 0.25.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных по экспрессии проводили, используя двухфакторный дисперсионный анализ и Fisher's LSD в качестве post hoc анализа. Параметры поведения анализировались с помощью Mann–Whitney U критерия. Различия между экспериментальными группами считались статистически значимыми при $p < 0.05$. Анализ данных производился с помощью пакета программ Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Относительная масса надпочечников. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил достоверное влияние факторов линии [$F(1,36) = 14.9$, $p = 0.0004$] и опыта агрессии [$F(1,36) = 8.8$, $p = 0.005$] на относительную массу надпочечников у мышей. Попарные сравнения между группами показали, что у мышей линии CD1 относительная масса надпочечников была ниже, чем у мышей линии C57BL ($p = 0.007$) (рис. 1).

Длительный опыт агрессии привел к снижению относительной массы надпочечников по сравнению с контролем как у линии CD1 ($p = 0.028$), так и у линии C57BL, но на уровне тенденции ($p = 0.06$).

Параметры поведения агрессивных животных. Поведение агрессивных животных оценивалось по взаимодействию с подчиненным самцом линии C57BL, имеющим опыт длительный опыт поражения. Параметры поведения при агрессивном взаимодействии и в тесте “Перегородка” пред-

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов, использованных в работе

Ген	Последовательность нуклеотидов	Последовательность 5' → 3'
<i>Crh</i>	Прямая (праймер)	GGAGAAGAGAGCGCCCCTAA
	Обратная (праймер)	AAGAAATTCAGGGCTGCGG
	Зонд	ROX-ATGCTGCTGGTGGCTCTGTCGTCC-BHQ2
<i>Crhr1</i>	Прямая (праймер)	GGTCCTGCTGATCAACTTTA
	Обратная (праймер)	ACATGTAGGTGATGCCCCA
	Зонд	ROX-CTGGGGTGCCTTTCCC-BHQ2
<i>Crhbp</i>	Прямая (праймер)	TCCATACCAGCACCAAACTG
	Обратная (праймер)	CAGCTCCACAAAGTCACCAG
	Зонд	ROX-ACTGAAGGCCATGCAAGTGTCCGA-BHQ2
<i>Fkbp5</i>	Прямая (праймер)	AGAATCAAACGGAAGGCGAG
	Обратная (праймер)	CTCGGCAATCAAATGTCCTTC
	Зонд	ROX-CCAAACGAAGGAGCAACGG-BHQ2
<i>Nr3c1</i>	Прямая (праймер)	ATGTATGACCAATGTAAACACA
	Обратная (праймер)	GCTCTTCAGACCTTCCTTAG
	Зонд	ROX-TGCAGGTATCCTATGAAGAG-BHQ2
<i>Drd1a</i>	Прямая (праймер)	GGAGAGCAGAGCGAGCG
	Обратная (праймер)	GGTTCAGTGCTCCAGGTCCG
	Зонд	ROX-AGCGTGGTCTCCCAGATC-BHQ2
<i>Fos</i>	Прямая (праймер)	CGGGTTTCAACGCCGACTA
	Обратная (праймер)	TTGGCACTAGAGACGGACAGA
	Зонд	ROX-AGTCCTGTGTGTTGACAGG-BHQ2
<i>Hk1</i>	Прямая (праймер)	ACATTGTCTCCTGCATCTCC
	Обратная (праймер)	GCTTTGAATCCCTTTGTCCAC
	Зонд	Cy5-CCTTCTCGTTTCCCTGCAAG-BHQ2
<i>Gpm6b</i>	Прямая (праймер)	CAAGTGCAGTGAAAGAGCTG
	Обратная (праймер)	TGTAGAACATAAACACTGGCAC
	Зонд	HEX-ACCTATGTGCTGGGAGTGGCCT-BHQ2

ставлены в табл. 2. По большинству исследуемых параметров поведение агрессоров двух линий не различалось. Тест Манна–Уитни (Mann–Whitney U test) выявил повышенное число ($p = 0.0012$) и длительность ($p = 0.031$) разбрасывания чужой подстилки, а также число ($p = 0.011$) и длительность ($p = 0.021$) вставаний на задние лапы у агрессоров линии CD1 по сравнению с линией C57BL.

Несмотря на схожий уровень враждебного поведения, который включает в себя поведение, направленное на причинение вреда другой особи (прямые атаки, агрессивный груминг, разбрасывание чужой подстилки), структура враждебного поведения у агрессоров двух линий значительно отличается (рис. 2). Доля непрямого агрессии

(разбрасывания чужой подстилки) преобладает в структуре враждебного поведения у агрессоров линии CD1, тогда как у линии C57BL преобладающей формой являются прямые атаки.

Уровень экспрессии генов в гипоталамусе. В данной работе мы оценили экспрессию семи генов в гипоталамусе у двух линий мышей (рис. 3). Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил достоверное влияние линии мышей на экспрессию пяти генов: *Crh* [$F(1.39) = 11.5, p = 0.002$], *Crhr1* [$F(1.39) = 12.9, p = 0.001$], *Crhbp* [$F(1.39) = 110.0, p < 0.001$], *Fkbp5* [$F(1.39) = 10.3, p = 0.003$], *Drd1a* [$F(1.38) = 243.5, p < 0.001$], и влияние на уровень экспрессии гена *Nr3c1* на уровне тенденции [$F(1.38) = 3.9, p = 0.057$]. У мышей линии C57BL была ниже экспрессия генов *Crhr1* ($p < 0.001$), *Crhbp*

Таблица 2. Поведение агрессоров двух линий в агрессивной конфронтации и в тесте “Перегородка”

Параметры поведения		C57BL	CD1
Прямые атаки	Число	3.6 ± 1.0	5.8 ± 1.8
	Время, с	39.1 ± 12.1	28.2 ± 5.9
	Лат. время, с	85.7 ± 24.1	68.8 ± 21.1
	% животных	75	83
Агрессивный груминг	Число	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.2
	Время, с	6.2 ± 4.2	1.6 ± 1.2
	% животных	25	17
Контакт с партнером	Число	5.9 ± 1.3	8.9 ± 1.6
	Время, с	23.3 ± 9.2	17.4 ± 4.0
Нахождение рядом с партнером	Число	13.3 ± 1.7	18.7 ± 1.7
	Время, с	24.5 ± 4.1	27.9 ± 3.7
Разбрасывание чужой подстилки	Число	2.6 ± 0.9	8.9 ± 1.0**
	Время, с	10.2 ± 4.1	22.9 ± 3.0*
Вставание на задние лапы	Число	5.8 ± 1.1	13.3 ± 1.9*
	Время, с	6.1 ± 2.0	13.6 ± 2.2*
Чистка тела	Число	2.0 ± 1.2	0.2 ± 0.1
	Время, с	1.8 ± 1.1	0.4 ± 0.3
Вращения	Число	0.4 ± 0.3	1.2 ± 0.3
	% животных	25	67
Враждебное поведение	Время, с	55.5 ± 8.8	52.7 ± 6.0
Суммарное время контакта с партнером	Время, с	93.2 ± 5.0	75.2 ± 7.8
Перегородка	Число	15.0 ± 0.9	16.1 ± 1.9
	Время, с	112.8 ± 8.4	98.7 ± 11.6
Число животных		8	12

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ по сравнению с агрессорами C57BL, Mann–Whitney U test.

($p < 0.001$), *Fkbp5* ($p = 0.005$), *Drd1* ($p < 0.001$) и выше экспрессия гена *Crh* ($p = 0.047$).

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил выраженное влияние длительного опыта агрессии на экспрессию только двух генов — *Crhbp* [$F(1.39) = 5.6$, $p = 0.023$] и *Fos* [$F(1.39) = 5.6$, $p = 0.023$]. А для экспрессии генов *Crhr1* [$F(1.39) = 6.8$, $p = 0.013$], *Crhbp* [$F(1.39) = 5.6$, $p = 0.023$] и на уровне тенденции для *Fos* [$F(1.39) = 3.8$, $p = 0.057$] было найдено взаимодействие факторов “линия” и “опыт агрессии”. Экспрессия гена *Crhbp* под влияние опыта агрессии снижалась у мышей линии CD1 ($p = 0.002$), и не изменялась у мышей линии C57BL. В таком же направлении было найдены изменения и для экспрессии гена *Crhr1*: снижение под влиянием опыта агрессии у мышей линии CD1 ($p = 0.021$), и отсутствие изменений у мышей линии C57BL. Экспрессия гена *Fos*, наоборот, была повышена только у агрессоров линии C57BL ($p = 0.005$)

по сравнению с контролем, тогда как у мышей линии CD1 под влиянием опыта агрессии она не менялась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Длительный повторный опыт агрессии значительно изменяет поведение, нейрохимию и физиологию особей [9, 10]. Ранее было показано, что для разных линий мышей последствия такого опыта могут быть различными. Так, для самцов мышей линии C57BL [8] и CBA/Lac [13] было показано формирование так называемой обученной агрессии, т.е. агрессии, которая проявляется без соответствующей провокации и характеризуется замещением прямых форм агрессии на непрямые. Уровень прямых атак снижается, хотя они полностью не прекращаются, а агрессоры в большей степени переключаются на проявление других

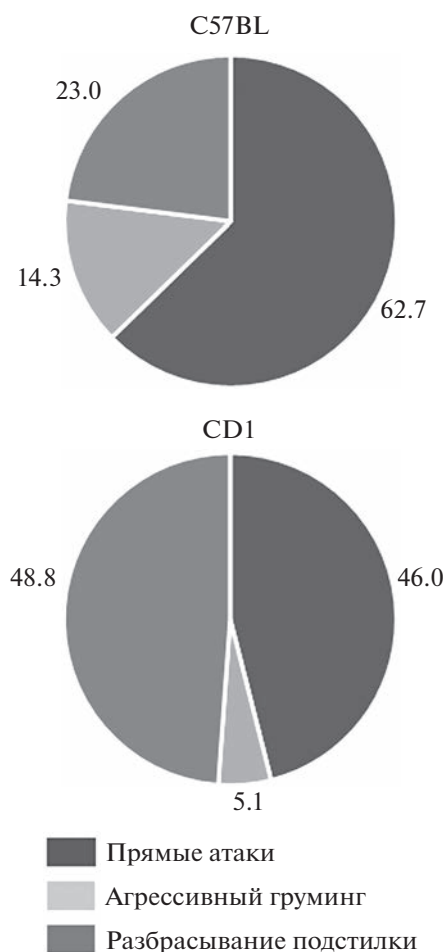


Рис. 2. Структура враждебного поведения агрессоров линии C57BL и CD1. Данные представлены в процентах от общего времени враждебного поведения каждой линии мышей.

форм враждебного поведения – агрессивный груминг, разбрасывание подстилки на территории партнера. Такие формы поведения сохраняются у обученных агрессоров даже при подсадке активного партнера [34]. При этом у других линий мышей длительный опыт агрессии может приводить к специфическими стереотипиям (гиперкинезам) (линия DBA/2) [35] или к гиперактивности и повышению исследовательской активности (линия CD1) [32].

Наше исследование показало, что при более продолжительном, чем ранее исследовали, опыте агрессии (в течение 30 дней) самцы мышей линий C57BL и CD1 продолжают проявлять прямые атаки на партнера, несмотря на проявление жертвами форм пассивной защиты (замирание при подходе агрессора и полная неподвижность), которые в норме подавляют проявление агрессии. Уровень прямых атак у агрессоров данных линий не отличается, также, как и общий уровень враждебного поведения (атаки, агрессивный груминг и разбра-

сывание чужой подстилки). Однако в структуре враждебного поведения можно видеть различия между линиями – у C57BL преобладают атаки (70%), тогда как у линии CD1 атаки и разбрасывание чужой подстилки составляет примерно равную долю (54 и 43% соответственно). Это может говорить о патологическом характере агрессии у линии C57BL, которая не подавляется ингибирующими стимулами и в меньшей мере, чем у линии CD1, замещается обученными формами поведения. Для самцов линии CD1, как и было показано ранее, характерны также более высокая исследовательская активность (вертикальные стойки) и общая гиперактивность.

В нашей работе у агрессоров обеих линий наблюдалось достоверное снижение относительной массы надпочечников. По данным литературы опыт агрессии в течение 21 дня приводит к повышению уровня кортикостерона [12]. Увеличение синтеза кортикостероидов при хроническом стрессе обычно приводит к гипертрофии надпочечников [36], однако у агрессивных животных было показано и отсутствие изменений в размере надпочечников при хроническом повышении уровня гормона в крови [9]. Причины снижения относительной массы надпочечников, выявленные в нашем эксперименте, требуют дополнительных исследований.

В нашей работе мы показали специфичные для каждой линии изменения экспрессии генов, связанные с длительным опытом агрессии, а также межлинейные различия в уровне экспрессии генов глюкокортикоидной системы в гипоталамусе.

Гипоталамус является важным звеном в проявлении агрессивного поведения, поскольку в нем расположена зона принятия решения об атаке (ЗПРА, hypothalamic attack area) [24], а кроме того, здесь же расположены паравентрикулярные ядра, которые являются ключевым звеном регуляции ответа на стресс, синтезируя КРГ. Показано, что электростимуляция ЗПРА, приводящая к проявлению атак, вызывает активацию и других зон гипоталамуса, в том числе и паравентрикулярных ядер [37]. Однако любое хроническое воздействие, как стресс, так и агрессия, часто приводит к патологическим изменениям ответа.

При агрессии активируется дофаминергическая система [14, 38], и длительный повторный опыт агрессии приводит к ее хронической активации [10, 15, 38]. Показано, что количество дофамина в гипоталамусе значительно повышается у крыс при агрессии [39]. Результаты исследований позволяют предположить, что дофамин провоцирует агрессию в том числе с помощью воздействия на ЗПРА [40].

Рецепторы дофамина делятся на две группы, в первую из которых попадают рецепторы D1 и D5, а во вторую D2, D3, D4. Наиболее распространенными являются рецепторы D1 подтипа. Ре-

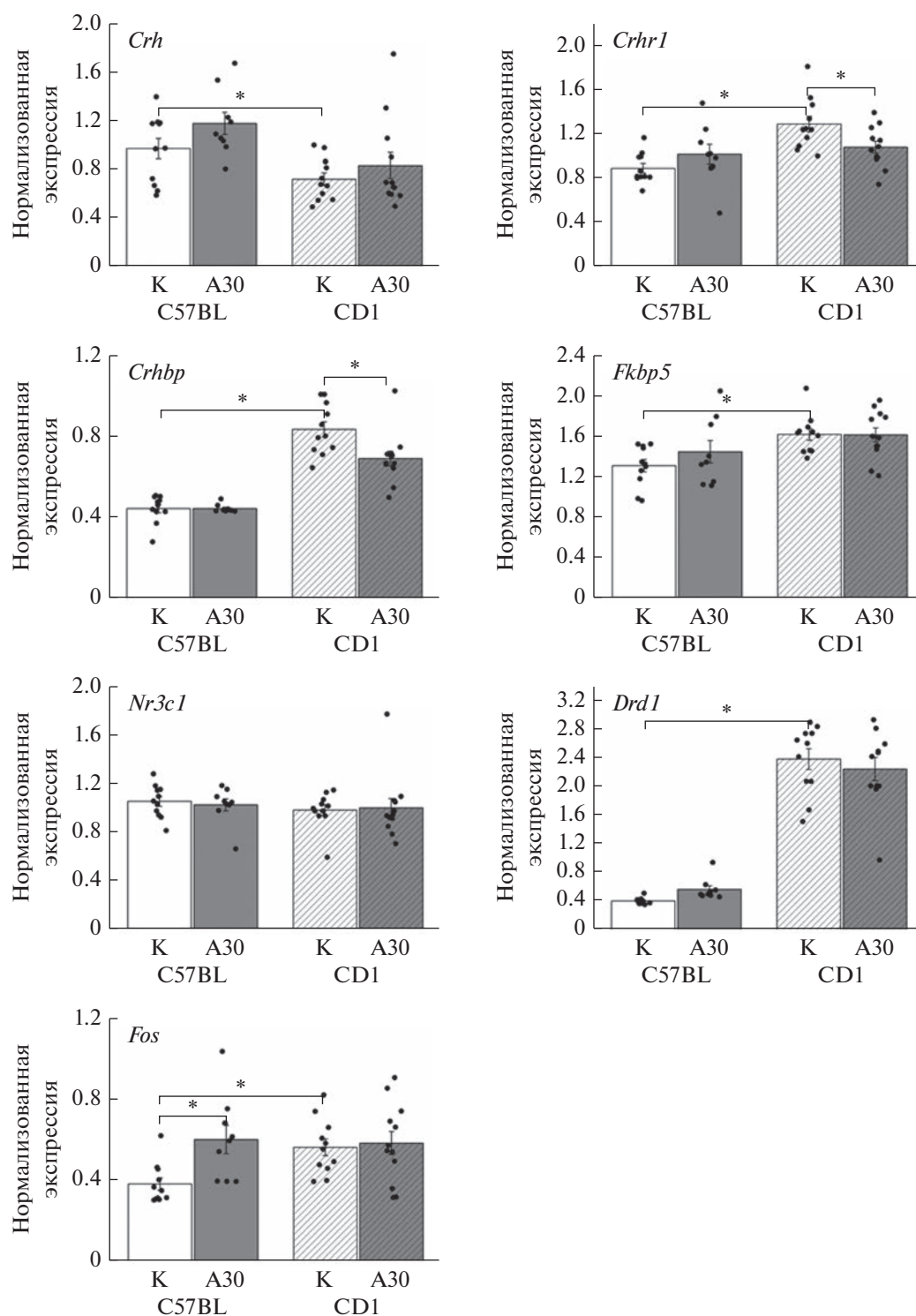


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов в гипоталамусе. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Двухфакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с использованием критерия Fisher's LSD, * $p < 0.05$. К — контрольная группа, А30 — мыши с опытом агрессии в течение 30 дней.

цепторы D1, в зависимости от региона мозга и функции несущих их нейронов, могут как снижать, так и повышать агрессию. Было показано, что активация рецепторов D1 в NAc связана с бо-

лее агрессивным поведением [40], а у склонных к спонтанной агрессии мышей количество D1 рецепторов в коре уменьшается [41]. Часть серотонинергических нейронов дорсального ядра шва

экспрессируют D1 рецепторы, и деактивация этих нейронов приводит к увеличению агрессии. Именно серотонинергические нейроны с D1 рецепторами являются частью нейронного контура агрессии и ведут в NAc, гиппокамп и ЗПРА [40]. Для мышей линии C57BL показано снижение чувствительности к блокаде D1 рецепторов при длительном опыте агрессии [42], то есть, вероятно, развивается десенситизация этих рецепторов при повышенной активности дофаминергической системы у агрессоров. Однако, несмотря на важную роль D1 рецептора в проявлении агрессии, в нашем эксперименте мы не выявили изменений в уровне экспрессии гена D1 рецептора *Drd1* у обеих линий мышей. Интересно, что в аналогичной модели у агрессоров линии C57BL с опытом агрессии в течение 20 дней также не находят изменений в уровне экспрессии D1 рецепторов в гиппокампе, стриатуме и вентральной области покрышки [43, 44]. Это говорит о сложной роли D1 рецепторов и неоднозначной регуляции экспрессии данного гена в проявлении агрессивного поведения.

В нашей работе мы показали, что опыт агрессии повышает (на уровне тенденции) уровень экспрессии *Crh*, причем у обеих линий мышей направление изменений одинаковое, хоть и не достигает статистической значимости. Количество секретируемого КРГ, поступающего дальше в гипофиз, модулируется продуктами генов *Crhr1* и *Crhbp*: в гипоталамусе рецепторы CRHR1 являются частью петли отрицательной обратной связи [45], а белок CRHBP связывает КРГ, снижая этим количество поступающего в гипофиз гормона [46]. Мы показали, что уровень экспрессии генов *Crhr1* и *Crhbp* снижается при длительном опыте агрессии, однако только у агрессоров линии CD1. Таким образом, это может указывать на адаптацию мышей линии CD1 к повторяющейся агрессии: некоторое увеличение уровня КРГ в совокупности со снижением уровня ингибиторов секреции КРГ может приводить к увеличению уровня доступности КРГ и усилению вызываемых им реакций.

Уровень экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора (ГР), *Nr3c1*, главного регулятора отрицательной обратной связи в гипоталамусе, не изменялся у агрессоров обеих линий. Можно предположить, что основные изменения при агрессии, влияющие на активность ГР, происходят не на транскрипционном уровне, а на уровне посттрансляционных механизмов, изменяющих его функциональное состояние [47]. Еще одним вариантом может быть развивающаяся у агрессоров резистентность к повышенному уровню активации ГГНС, что не приводит к ее подавлению через активацию системы отрицательной обратной связи. В пользу последнего свидетельствует и отсутствие изменений в уровне экспрессии гена *Fkbp5*, кодирующего ко-шаперон ГР, белок FKBP51, который

участвует в удержании ГР в цитоплазме, и регулирует, соответственно, уровень неактивного рецептора [48, 49]. В других работах по оценке уровня ГР у агрессивных животных также не находят изменения на уровне экспрессии гена ни в гипоталамусе у крыс с повышенной агрессией [50], ни в гиппокампе у крыс, селектированных на повышенную агрессивность [20], ни даже в уровне белка ГР в разных структурах мозга [51].

Для мышей линии C57BL мы показали увеличение уровня экспрессии гена *Fos* у агрессивных животных. Продукт гена раннего ответа *Fos* является транскрипционным фактором, который коррелирует с активностью экспрессии генов в нейронах и используется как маркер активности нейронов, в том числе при исследовании агрессивного поведения [40]. Было показано, что через 2 ч после однократного агрессивного взаимодействия у крыс происходит активация *Fos* практически во всех структурах мозга [52]. У агрессоров линии CD1 с опытом агрессии в течении 10 дней было показано увеличение уровня *Fos* в прилежащих ядрах через час после агрессивного взаимодействия [53]. В нашей работе через 24 ч после последней агрессивной конфронтации уровень экспрессии гена *Fos* в гипоталамусе остается повышенным только у агрессоров линии C57BL, тогда как у линии CD1 он снижается до уровня контроля, что свидетельствует о более длительной активации гипоталамуса у мышей линии C57BL.

Таким образом, несмотря на схожий уровень проявления агрессии, последствия такого длительного опыта на уровне активации экспрессии генов в гипоталамусе для двух линий различаются. Для C57BL характерна более продолжительная активация *Fos*, хотя экспрессия других исследованных генов практически не изменена. Агрессоры линии CD1 характеризуются повышением уровня биодоступного КРГ через снижение синтеза ингибиторов его секреции.

В нашей работе были показаны межлинейные различия в уровне экспрессии генов в гипоталамусе. Такие различия были найдены для большинства из исследованных генов (5 из 7). Линия CD1 характеризуется более высоким уровнем экспрессии *Crhr1*, *Crhbp*, *Fkbp5*, *Drd1* и более низким — гена *Crh*. Самым выраженным различием между линиями является вдвое увеличенная экспрессия гена *Drd1*. Согласно результатам нашего исследования, экспрессия гена *Drd1* не связана с агрессией. Однако в гипоталамусе существуют популяции дофаминергических нейронов, связанных не только с агрессией, но и с другими физиологическими функциями. Нейроны высвобождают дофамин за пределы гипоталамуса и регулируют секрецию пролактина [54], пищевое поведение [55], циркадианные ритмы [56]. Поэтому повышенная экспрессия D1 рецепторов у линии CD1

может быть связана и с различиями в других физиологических функциях. Кроме того, известно, что более высокая активность дофаминергической системы связана с повышенной двигательной активностью [57]. Хотя нет достоверных данных о участии гипоталамуса в регуляции спонтанной двигательной активности, повышенное количество D1 рецепторов может быть связано с общей повышенной активностью дофаминергической системы у линии CD1. Двигательная активность у мышей линии CD1 выше, чем у линии C57BL, что показано как в тесте открытого поля [32], так и в нашем эксперименте, по более частым вертикальным стойкам и числу вращений.

Кроме уровня экспрессии D1 рецептора, между линиями значимо различалась активность КРГ — более низкая экспрессия *Crh* у мышей линии CD1 сопровождалась более высокой экспрессией *Crhr1* и *Crhbp*, что суммарно должно приводить к снижению доступного КРГ и, соответственно, снижению реактивности ГНС. Эти данные подтверждаются более низким уровнем тревожности у мышей линии CD1 по сравнению с линией C57BL [58, 59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные показывают, что, несмотря на схожий уровень прямой агрессии, структура враждебного поведения у самцов мышей линии C57BL и линии CD1 различается. Проявление агрессивного поведения у мышей линии C57BL носит больше патологический характер. Возможно с этим связана и разница в последствиях длительного опыта агрессии на уровень экспрессии генов в гипоталамусе. Для агрессоров линии C57BL характерна более продолжительная активация *Fos*, хотя экспрессия других исследованных генов практически не изменена. Агрессоры линии CD1 характеризуются повышением уровня биодоступного КРГ, через снижение синтеза ингибиторов его секреции. Для большинства исследованных генов показаны межлинейные различия в уровне экспрессии, которые, вероятно, связаны с разным уровнем двигательной активности и тревожности. Таким образом, последствия длительного опыта агрессии на структуру агрессивного поведения и уровень активности генов в гипоталамусе зависит от генетических особенностей линии и связанных с этим психофизиологических характеристик особей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при финансовой поддержке бюджетного проекта FWNR-2022—0016.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Все авторы подтверждают, что они знакомы с финальной версией рукописи и не имеют каких-либо конфликтов интересов.

Этическое одобрение. Все процедуры с использованием данной модели стресса одобрены этическим комитетом ИЦиГ СО РАН (протокол № 20.1 от 11 марта 2014 г.). Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лоренц К. // Агрессия (так называемое “зло”). СПб: Амфора, 2001. Р. 349 р.
2. Moyer K.E. // Violence and Aggression. N.Y.: Paragon House, 1987. Р. 237 р.
3. Barratt E.S., Stanford M.S., Kent T.A., Felthous A. // Biol. Psychiatry. 1997. V. 41. № 10. Р. 1045—1061.
4. Bushman B.J., Anderson C.A. // Psychological Review. 2001. V. 108. N. 1. Р. 273—279.
5. Dugatkin L.A. // Behavioral Ecology. 1997. V. 8. № 6. Р. 583—587.
6. Hsu Y., Wolf L.L. // Anim. Behav. 1999. V. 57. № 4. Р. 903—910.
7. Oyegbile T.O., Marler C.A. // Horm. Behav. 2005. V. 48. № 3. Р. 259—267.
8. Kudryavtseva N.N., Bondar N.P., Alekseyenko O.V. // Aggressive Behavior. 2000. V. 26. № 5. Р. 386—400.
9. Bartolomucci A., Pederzani T., Sacerdote P., Panerai A.E., Parmigiani S., Palanza P. // Psychoneuroendocrinology. 2004. V. 29. № 7. Р. 899—910.
10. Kudryavtseva N.N. // Aggress. Violent Behav. 2020. V. 52. № P. 101403.
11. Chase I.D., Bartolomeo C., Dugatkin L.A. // Anim. Behav. 1994. V. 48. № P. 393—400.
12. Bartolomucci A., Palanza P., Gaspari L., Limiroli E., Panerai A.E., Ceresini G., Poli M.D., Parmigiani S. // Physiol. Behav. 2001. V. 73. № 3. Р. 401—410.
13. Kudryavtseva N.N., Bondar N.P., Avgustinovich D.F. // Behav. Brain Res. 2002. V. 133. № 1. Р. 83—93.
14. Van Erp A.M., Miczek K.A. // J. Neurosci. 2000. V. 20. № 24. Р. 9320—9325.
15. Bondar N.P., Boyarskikh U.A., Kovalenko I.L., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. // PLoS One. 2009. V. 4. № 1. Р. e4190.
16. Haller J., Kruk M.R. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2006. V. 30. № 3. Р. 292—303.
17. Natarajan D., de Vries H., Saaltink D.J., de Boer S.F., Koolhaas J.M. // Behav. Genet. 2009. V. 39. № 1. Р. 73—90.
18. Walker S.E., Papilloud A., Huzard D., Sandi C. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2018. V. 91. № P. 138—152.
19. Caramaschi D., de Boer S.F., de Vries H., Koolhaas J.M. // Behav. Brain Res. 2008. V. 189. № 2. Р. 263—272.

20. Veenema A.H., Meijer O.C., De Kloet E.R., Koolhaas J.M., Bohus B.G. // *Horm. Behav.* 2003. V. 43. № 1. P. 197–204.
21. Beiderbeck D.I., Reber S.O., Havasi A., Bredewold R., Veenema A.H., Neumann I.D. // *Psychoneuroendocrinology*. 2012. V. 37. № 12. P. 1969–1980.
22. Neumann I.D., Veenema A.H., Beiderbeck D.I. // *Front. Behav. Neurosci.* 2010. V. 4. № P. 12.
23. Toth M., Fuzesi T., Halasz J., Tulogdi A., Haller J. // *Behav. Brain Res.* 2010. V. 215. № 1. P. 7–20.
24. Lin D., Boyle M.P., Dollar P., Lee H., Lein E.S., Perona P., Anderson D.J. // *Nature*. 2011. V. 470. № 7333. P. 221–226.
25. Hrabovszky E., Halasz J., Meelis W., Kruk M.R., Liposits Z., Haller J. // *Neuroscience*. 2005. V. 133. № 3. P. 657–666.
26. Inda C., Armando N.G., Dos Santos Claro P.A., Silberstein S. // *Endocrine Connections*. 2017. V. 6. № 6. P. R99–R120.
27. de Boer S.F., van der Vegt B.J., Koolhaas J.M. // *Behav. Genet.* 2003. V. 33. № 5. P. 485–501.
28. Miczek K.A., Maxson S.C., Fish E.W., Faccidomo S. // *Behav. Brain Res.* 2001. V. 125. № 1–2. P. 167–181.
29. Parmigiani S., Palanza P., Rogers J., Ferrari P.F. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999. V. 23. № 7. P. 957–969.
30. Hsieh L.S., Wen J.H., Miyares L., Lombroso P.J., Bordey A. // *Neurosci. Lett.* 2017. V. 637. P. 142–147.
31. Ducottet C., Belzung C. // *Behav. Brain Res.* 2005. V. 156. № 1. P. 153–162.
32. Kovalenko I.L., Smagin D.A., Galyamina A.G., Kudryavtseva N.N. // *Journal of Behavioral and Brain Science*. 2015. V. 5. № 11. P. 478–490.
33. Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L., Vishnivetskaya G.B. // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. № 11. P. 2705–2717.
34. Бондарь Н.П., Кудрявцева Н.Н. // *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*. 2005. V. 55. № 3. P. 378–384.
35. Вишинецкая Г.Б., Августиневич Д.Ф., Кудрявцева Н.Н. // *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*. 2013. V. 63. № 2. P. 235–245.
36. Herman J.P., Adams D., Prewitt C. // *Neuroendocrinology*. 1995. V. 61. № 2. P. 180–190.
37. Halasz J., Liposits Z., Meelis W., Kruk M.R., Haller J. // *Neuroreport*. 2002. V. 13. № 10. P. 1267–1270.
38. Ferrari P.F., van Erp A.M., Tornatzky W., Miczek K.A. // *Eur. J. Neurosci.* 2003. V. 17. № 2. P. 371–378.
39. Barr G.A., Sharpless N.S., Gibbons J.L. // *Brain Res.* 1979. V. 166. № 1. P. 211–216.
40. Aleyasin H., Flanigan M.E., Russo S.J. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2018. V. 49. № P. 184–191.
41. Felipe R.M., Oliveira G.M., Barbosa R.S., Esteves B.D., Gonzaga B.M.S., Horita S.I.M., Garzoni L.R., Beghini D.G., Araujo-Jorge T.C., Fragoso V.M.S. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021. V. 15. P. 696834.
42. Бондарь Н.П., Кудрявцева Н.Н. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2003. V. 89. № 8. P. 992–1000.
43. Смагин Д.А., Галямина А.Г., Коваленко И.Л., Бабенко В.Н., Тамкович Н.В., Борисов С.А., Толстикова Т.Г., Кудрявцева Н.Н. // *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*. 2018. V. 68. № 2. P. 227–249.
44. Babenko V.N., Galyamina A.G., Rogozin I.B., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. // *BMC Neurosci.* 2020. V. 21. № 1. P. 12.
45. Preil J., Muller M.B., Gesing A., Reul J.M., Sillaber I., van Gaalen M.M., Landgrebe J., Holsboer F., Stenzel-Poore M., Wurst W. // *Endocrinology*. 2001. V. 142. № 11. P. 4946–4955.
46. Ketchesin K.D., Stinnett G.S., Seasholtz A.F. // *Stress*. 2017. V. 20. № 5. P. 449–464.
47. Merkulov V.M., Merkulova T.I., Bondar N.P. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2017. V. 82. № 3. P. 351–365.
48. Меркулов В.М., Климова Н.В., Меркулова Т.И. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. V. 19. № 3. P. 255–263.
49. Pratt W.B., Galigniana M.D., Morishima Y., Murphy P.J. // *Essays in Biochemistry*. 2004. V. 40. № P. 41–58.
50. Walker S.E., Zanoletti O., Guillot de Suduiraut I., Sandi C. // *Psychoneuroendocrinology*. 2017. V. 84. № P. 1–10.
51. Scotti M.A., Rendon N.M., Greives T.J., Romeo R.D., Demas G.E. // *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*. 2015. V. 323. № 5. P. 331–341.
52. Halasz J., Liposits Z., Kruk M.R., Haller J. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 15. № 3. P. 561–569.
53. Golden S.A., Jin M., Heins C., Venniro M., Michaelides M., Shaham Y. // *J. Neurosci.* 2019. V. 39. № 13. P. 2482–2496.
54. Stagkourakis S., Kim H., Lyons D.J., Broberger C. // *Cell Rep.* 2016. V. 15. № 4. P. 735–747.
55. Chadwick S.R., Guler A.D. // *iScience*. 2022. V. 25. № 7. P. 104605.
56. Romanov R.A., Zeisel A., Bakker J., Girach F., Hellysaz A., Tomer R., Alpar A., Mulder J., Clotman F., Keimpema E., Hsueh B., Crow A.K., Martens H., Schwindling C., Calvignoni D., Bains J.S., Mate Z., Szabo G., Yanagawa Y., Zhang M.D., Rendeiro A., Farlik M., Uhlen M., Wulff P., Bock C., Broberger C., Deisseroth K., Hokfelt T., Linnarsson S., Horvath T.L., Harkany T. // *Nat. Neurosci.* 2017. V. 20. № 2. P. 176–188.
57. Beninger R.J. // *Brain Res.* 1983. V. 287. № 2. P. 173–196.
58. Michalikova S., van Rensburg R., Chazot P.L., Ennaceur A. // *Behav. Brain Res.* 2010. V. 207. № 2. P. 402–417.
59. Benatti C., Alboni S., Montanari C., Caggia F., Tascadda F., Brunello N., Blom J.M. // *Behav. Brain Res.* 2011. V. 224. № 1. P. 23–34.

Repeated Experience of Aggression Changes Gene Expression in Hypothalamus in Male Mice of Two Strains

A. A. Sapronova^a, P. E. Kisaretova^{a, b}, R. Salman^{a, b}, and N. P. Bondar^{a, b}

^a Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

^b Novosibirsk State Research University, Novosibirsk, Russia

Repeated positive fighting experience can lead to changes in the neurophysiology and behavior of animals and to the formation of pathological aggression. Mechanisms of adaptation to repeated aggression are thought to be controlled through hypothalamus and HPA axis. In this work, we studied the effect of repeated (30 days) experience of aggression on gene expression in the hypothalamus in male mice of two strains — C57BL/6J and CD1. We measured expression levels of the HPA axis genes (*Crh*, *Crhr1*, *Crhbp*, *Fkbp5*, *Nr3c1*), as well as early response gene (*Fos*) and dopamine receptor D1 gene (*Drd1*). Repeated experience of aggression led to prolongation of *Fos* activation in C57BL/6J, although the expression of other studied genes remained unchanged. CD1 aggressors are characterized by decreased expression level of *Crhr1* and *Crhbp* genes, whose products inhibit the secretion of corticotropin-releasing hormone. Most of the studied genes showed strain variation in gene expression that is probably associated with different levels of locomotor activity and anxiety in mice of these strains. The basal expression level of *Crh* gene was higher in C57BL/6J mice, while *Crhr1*, *Crhbp*, *Fkbp5*, *Fos*, and *Drd1* genes were higher in CD1 mice. Thus, the repeated experience of aggression leads to gene expression changes in the hypothalamus of male mice, that depend on the genetic background and related psychophysiological features of individuals.

Keywords: repeated aggression, hypothalamus, HPA, CD1 mice, C57BL/6J mice

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577

ИНГИБИТОР JNK (с-Jun N-ТЕРМИНАЛЬНОЙ КИНАЗЫ) IQ-1S ПОДАВЛЯЕТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ СТАРЕНИЕ МОЗГА КРЫС OXYS

© 2023 г. А. А. Жданкина^{1, *}, А. Н. Осипенко¹, Д. И. Тихонов¹, С. В. Логвинов¹,
М. Б. Плотников², А. И. Хлебников³, Н. Г. Колосова⁴

¹ Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный
медицинский университет, Томск, Россия

² “Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга”
Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук”, Томск, Россия

³ Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера, Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования “Томский политехнический университет”, Томск, Россия

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 09.02.2023 г.

После доработки 01.03.2023 г.

Принята к публикации 09.03.2023 г.

По данным международной организации Alzheimer’s Disease International (ADI) в мире около 50 млн человек страдает Болезнью Альцгеймера (БА). Однако эффективных методов профилактики и замедления прогрессии БА не существует. Ингибирование сигнального пути N-концевой киназы с-Jun (JNK) обсуждается как альтернативный способ профилактики развития БА и других нейродегенеративных заболеваний. В настоящем исследовании мы оценивали способность недавно обнаруженного селективного ингибитора JNK3 — натриевой соли 11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксима (IQ-1S) подавлять нейродегенеративные процессы у крыс OXYS на ранней стадии развития признаков БА в возрасте с 4.5 до 6 мес. Лечение IQ-1S (50 мг/кг внутривенно) привело к подавлению развития нейродегенеративных процессов в коре мозга крыс OXYS: увеличению доли неизмененных нейронов, снижению доли нейронов с признаками деструкции и необратимых повреждений, нормализации показателя глионейронального индекса. Одним из возможных механизмов нейропротекторного действия JNK3 может быть улучшение микроциркуляции в мозговой ткани за счет снижения выраженности синдрома повышенной вязкости крови у крыс OXYS. Применение ингибитора JNK3 IQ-1S может стать перспективной стратегией для профилактики ранних нейродегенеративных нарушений и, возможно, лечения БА.

Ключевые слова: старение мозга, нейродегенерация, крысы OXYS, ингибитор JNK, натриевая соль 11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксима, реологические свойства крови

DOI: 10.31857/S1027813323030214, **EDN:** YVJZKI

ВВЕДЕНИЕ

Возраст — основной фактор риска Болезни Альцгеймера (БА), которая становится самой распространенной причиной сенильной деменции. По данным международной организации Alzheimer’s Disease International (ADI) в мире около 50 млн человек страдает БА и, по прогнозам, это количество будет удваиваться каждые 20 лет [1]. В связи с этим особую актуальность приобрела разработка способов профилактики БА: согласно прогнозу, создание к 2025 г. способа задержки начала заболевания на 5 лет могло бы снизить в 2050 г. количество страдающих им людей на 50% [2]. Од-

нако эффективных методов профилактики и замедления прогрессии БА не существует, несмотря на значительные инвестиции в их разработку. В значительной мере это обусловлено тем, что стратегия создания лекарственных средств для лечения БА в течение последних 30 лет была направлена на амилоидную патологию как центральное событие в патогенезе заболевания. Однако существенное расширение представлений о наиболее распространенной (>95% случаев) спорадической форме БА как заболевании многофакторной природы показало, что оптимальным подходом к его лечению может стать терапия, способная воздействовать на системные механизмы старения, которые лежат в основе всех связанных с ним заболеваний. Как одна из потенциальных мишеней

* Адресат для корреспонденции: 634050 Томск, ул. Учебная, 39, e-mail: annazhdank@yandex.ru.

для таких воздействий рассматривается эволюционно консервативный сигнальный путь N-концевой киназы c-Jun (JNK) [3]. JNK — член семейства митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), представленный тремя изоформами: JNK1, JNK2 и JNK3. JNKs фосфорилируют множество транскрипционных факторов, связанных с апоптозом, и индуцируют его [3]. В отличие от JNK1 и JNK2, JNK3 в основном экспрессируется в головном мозге, JNK3 фосфорилирует белок-предшественник амилоида APP и способствует его превращению в амилоид бета. Также JNK3 непосредственно фосфорилирует тау-белок, регулируя образование нейрофибриллярных клубков [4–6]. Ранее сообщалось об активации JNK3 в головном мозге пациентов с семейной формой БА и о том, что ее уровень коррелирует со снижением когнитивных функций у пациентов [7]. В настоящее время активно проводится поиск ингибиторов JNK3, многие из которых уже подтвердили свою эффективность на различных моделях ранней (наследственной) формы БА [8, 9]. В настоящем исследовании нами проведена оценка нейропротекторных эффектов нового селективного ингибитора JNK — натриевой соли 11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксима (IQ-1S), которая, как было установлено в экспериментах *in silico* и *in vitro*, обладает повышенным аффинитетом в отношении JNK3 [10–12]. Исследование выполнено на крысах OXYS — модели преждевременного старения, одним из проявлений которого становится ускоренное старение мозга, сопровождающееся спонтанным развитием всех ключевых признаков БА. Их последовательность: дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование тау-белка, сиnapтическая недостаточность, деструктивные изменения нейронов, нарушения поведения и снижение когнитивных функций на ранних стадиях и их прогрессия на фоне повышения уровня белка-предшественника амилоида APP, усиленного накопления амилоида бета и образования амилоидных бляшек в мозге — соответствует современным представлениям о патогенезе спорадической формы БА [13]. Отсутствие характерных для ранней формы заболевания мутаций в генах App, Psen1 и Psen2 позволяет рассматривать крыс OXYS как уникальную модель спорадической формы БА [14]. Уже в молодом возрасте у этих животных наблюдаются явления цереброваскулярной дисфункции [15] и нарушение реологических свойств крови [16], последнее приводит к снижению эффективности транспорта кислорода, а гипоксия мозговой ткани, как известно, способствует ускоренному снижению когнитивных функций и развитию БА [17]. Недавно мы показали, что IQ-1S способен угнетать развитие у крыс OXYS признаков возрастной макулярной дегенерации, которая также становится проявлением преждевременного старения этих животных [18]. Целью настоящего

исследования явилась оценка способности IQ-1S влиять на развитие нейродегенеративных процессов в коре мозга, на состояние церебральных сосудов и на реологические свойства крови на ранних стадиях развития признаков БА у крыс OXYS.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на крысах самцах сток Вистар и линии OXYS, которые были получены из ЦКП “Генофонды лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН, в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных (“Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях”). Крыс содержали группами по пять особей в клетках размером 57 × 36 × 20 см при температуре 22 ± 2°C в условиях фиксированного режима освещения (12 ч свет/12 ч темнота) при свободном доступе к воде и пище — стандартному гранулированному корму для лабораторных животных (Чара, ЗАО “Ассортимент Агро”, Россия). Для оценки эффектов IQ-1S 4-месячные крысы OXYS были случайным образом распределены на две группы по 10 животных. Крысам OXYS опытной группы в течение 45 дней (с возраста 4.5 до 6 мес.) внутрижелудочно вводили IQ-1S в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2 мл 1% крахмальной слизи. Крысы OXYS контрольной группы получали крахмальную слизь. Дополнительным контролем служили 10 крыс Вистар, которым также ежедневно вводили крахмальную слизь. Исследование на животных одобрено комиссией по биоэтике СибГМУ (протокол № 4008/4/06/2022 от 20.06.2022). Были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму количество используемых животных и их дискомфорт. Эвтаназию осуществляли ингаляцией CO₂.

IQ-1S. Натриевую соль 11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксима (IQ-1S) (серия M314) синтезировали, как описано ранее [10], на кафедре биотехнологии и органической химии Томского политехнического университета, Томск, Россия. Химическая структура IQ-1S подтверждена методами масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса; чистота субстанции составила 99.9%. Для приготовления суспензии навеску порошка IQ-1S, соответствующую надлежащей дозе для животного, асептически растирали пестиком с 20 мкл Tween 80; добавляли 2 мл 1% крахмальной слизи для создания суспензии.

Гистологическое исследование. Для гистологического исследования мозг экспериментальных животных фиксировали в 10% нейтральном формальдегиде на 0.1 моль/л фосфатном буфере (pH 7.4) и заливали в парафин по стандартной методике [20], делали серийные фронтальные срезы (толщиной от 4 до 5 мкм), окрашивали толуиди-

новым синим по методу Ниссля, выделяли сенсомоторную область коры головного мозга (поля Fpa и Fpp) с использованием стереотаксического атласа мозга взрослой крысы [21] и исследовали с помощью микроскопа (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Германия). Морфометрические параметры измеряли с помощью количественного анализа изображений, выполненного с помощью программного обеспечения Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY). Оценку проводили путем исследования пяти срезов мозга каждого животного при увеличении 10×100 с использованием кадра площадью 900 мкм^2 . Измеряли удельную площадь сосудов (открытых и со стазом, сладжем или тромбозом). Отдельно подсчитывали количество нейронов с центральным и тотальным хроматолизом, гиперхромных нейронов без признаков сморщивания и гиперхромных сморщенных нейронов, а также перинейрональных глиоцитов с ядерным пикнозом и отеком перикариона на 200 соответствующих клеток II, IV и V слоев коры. Рассчитывали численную плотность ядер нейронов и перинейрональных глиоцитов в окулярной рамке 900 мкм^2 , которые затем пересчитывали на площадь 1 мм^2 среза.

Электронная микроскопия. Образцы сенсомоторной области коры головного мозга контрольных и опытных крыс OXYS и крыс Wistar ($n = 5$ в группе) фиксировали 2.5% глутаральдегидом в 0.1 М буфере какодилата натрия (pH 7.2) в течение 1 ч, промывали 0.1 М буфером какодилата натрия и постфиксировали в 1% четырехокиси осмия в том же буфере в течение 1 ч. После этого образцы промывали водой и инкубировали в 1% водном растворе уранилацетата в темноте при КТ в течение 1 ч. Затем образцы обезвоживали, используя градуированную серию смесей этанола и ацетона, и заливали смесью эпон-аралдитных смол. Сначала на ультратоме делали полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали их толуидиновым синим, затем делали ультратонкие срезы. Ультратонкие срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца, а затем исследовали под просвечивающим электронным микроскопом (JEM 100 SX; Jeol, Токио, Япония) в Межведомственном объединенном центре микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики РАН. На электронных микрофотографиях сенсомоторной области коры головного мозга (по 45 фото на группу животных) все органеллы, расположенные в этих областях, окрашивали с помощью программы Adobe Photoshop. Для каждой фотографии определяли следующий параметр: удельную суммарную площадь каждого типа органелл, расположенных в электронно-прозрачных участках нейронов.

Гемореологические показатели. Для оценки гемореологических параметров пробы крови забирали у наркотизированных диэтиловым эфиром

крыс из общей сонной артерии. Кровь стабилизировали 3.8% раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1. Вязкость цельной крови измеряли на ротационном вискозиметре Brookfield DV-II + Pro с системой “конус/плоскость” при температуре 36°C в диапазоне скоростей сдвига от 15 до 450 с^{-1} , вязкость плазмы — при скорости сдвига 450 с^{-1} . Гематокрит определяли методом центрифугирования в стеклянных капиллярах (центрифуга PC-6, 2000 об./мин, время центрифугирования 15 мин) и выражали в процентах. Концентрацию фибриногена в плазме оценивали методом тромбообразования Клауса с использованием набора реагентов для определения концентрации фибриногена “Фибриноген-тест” на гемокоагулометре “Cotman KG-4”. Деформируемость эритроцитов исследовали на анализаторе RheoScan-AnD 300 диапазоне напряжений сдвига 7–20 Па. Индекс доставки тканям кислорода рассчитывали, как отношение вязкости цельной крови к гематокриту [22].

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10 (Statsoft, США) с использованием методов вариационной статистики. Нормальность распределения выборки определяли при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий при сравнении средних значений использовали непараметрические критерии Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Экспериментальные данные в тексте представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

IQ-1S ослабляет дегенеративные изменения в коре головного мозга крыс OXYS. Как показало настоящее исследование, в сенсомоторной области коры головного мозга контрольных крыс OXYS в возрасте 6 мес. признаки нейродегенерации были достаточно ярко выражены во всех слоях: выявлялись отеки перикарионов нейронов, глии, сосудов, микроциркуляторные нарушения, конденсация хроматина с развитием гиперхроматоза ядер со сморщиванием и без него, хроматолиз нейронов различной степени выраженности. Все эти изменения были видны как на обзорных снимках, так и при большом увеличении (рис. 1).

Количественная оценка выявила во всех исследованных слоях коры мозга крыс OXYS увеличение доли нейронов, измененных по темному типу — с развитием гиперхроматоза ядер и цитоплазмы, и по светлому типу — с растворением хроматофильной субстанции и развитием хроматолиза. Об этом свидетельствует достоверное увеличение у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар процента гиперхромных нейронов со сморщива-

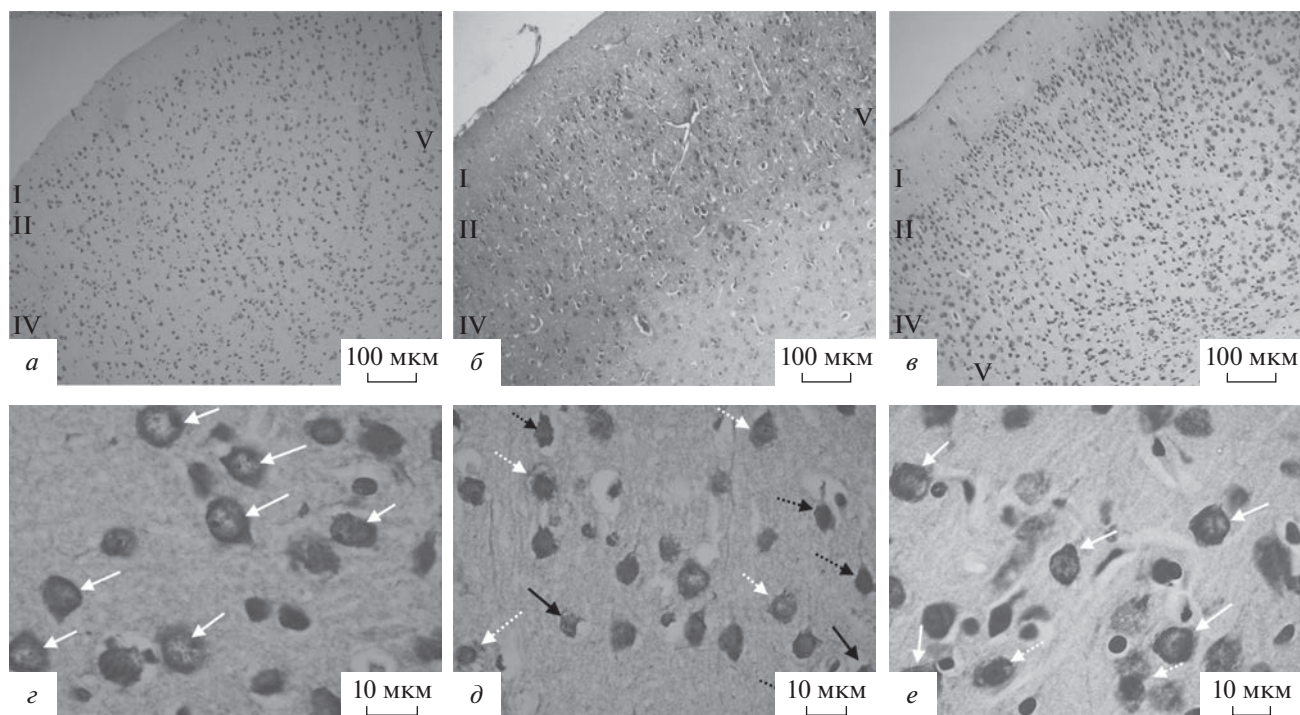


Рис. 1. Кора головного мозга крыс Вистар (*а, г*), контрольных крыс OXY (*б, д*) и крыс OXY, получавших IQ-1S (*в, е*). *а, б, в* — обзорные снимки, *г, д, е* — IV слой коры. На обзорном снимке контрольных крыс OXY (*б*) видны выраженные деструктивные изменения нейронов и глии. У крыс Вистар преобладают нормохромные нейроны (белые стрелки), в ядрах определяются ядрышки. У крыс OXY контрольной группы наблюдаются деструктивные изменения нейронов — по темному типу с конденсацией хроматина, сморщиванием ядра и цитоплазмы (черные пунктирные стрелки), по светлому типу: очаговый хроматолиз (белые пунктирные стрелки), тотальный хроматолиз (черные стрелки). Под влиянием IQ1S необратимых повреждений клеток становится меньше. Окраска крезиловым фиолетовым по Нисслю (*а, в, г, д, е*), толуидиновым синим (*б*).

нием ядра и цитоплазмы, свидетельствующих о необратимом их повреждении и гиперхромных нейронов без сморщивания, появление которых связывают либо с увеличением, либо снижением их функциональной активности [23], а также нейронов с тотальным и очаговым хроматолизом. Пирамидные нейроны II и V слоев коры крыс OXY более подвержены изменениям по темному типу, тогда как чувствительные нейроны IV слоя чаще подвергаются хроматолизу, и именно в этом слое зарегистрирован наибольший процент нейронов с тотальным хроматолизом, также свидетельствующим о необратимом повреждении нейронов (табл. 1). На ультраструктурном уровне деструктивные изменения нейронов сопровождались разрушением цистерн гранулярного ЭПР, накоплением в клетках продуктов деградации мембранных структур в виде отложения гранул липофусцина, выявлялись митохондрии с деструкцией крист и появлением в матриксе электронно-плотного содержимого (рис. 2).

Подсчет удельной площади органелл в цитоплазме нейронов IV слоя коры головного мозга исследованных животных показал, что у крыс OXY контрольной группы снижена по сравне-

нию с крысами Вистар удельная площадь гранулярного ЭПР в 2.3 раза, митохондрий — в 1.9 раза, а удельная площадь лизосом и вакуолей при этом увеличена в 10 и 4.6 раза соответственно ($p < 0.05$; табл. 2).

Клетки глии активно включаются как в процессы обеспечения жизнедеятельности, так и гибели нейронов. Во всех исследованных слоях коры головного мозга крыс OXY были выявлены признаки активации глии, на которое указывало увеличение глионейронального индекса — соотношения клеток глии и нейронов ($p < 0.05$; табл. 1). Это было обусловлено главным образом увеличением численной плотности глии, поскольку значимых различий в плотности нейронов в коре крыс OXY и Вистар выявлено не было. Наряду с увеличением плотности глии, в коре мозга крыс OXY возрастает процент деструктивно измененных глиоцитов ($p < 0.05$; табл. 1).

Выявленные нами патологические изменения в коре мозга крыс OXY развивались на фоне значительных нарушений в церебральных сосудах. Наряду с открытыми функционирующими сосудами с небольшим количеством форменных элементов в просвете, в коре мозга крыс OXY присутство-

Таблица 1. IQ-1S подавляет деструктивные изменения нейронов и глии сенсомоторной области коры головного мозга крыс OXYS

Показатель		Вистар	OXYS	OXYS + IQ-1S
Гиперхромные сморщенные нейроны, %	II слой	0	$4.00 \pm 0.30^*$	$1.3 \pm 0.44^{*+}$
	IV слой	0	$1.60 \pm 0.51^*$	0.20 ± 0.20
	V слой	0	$4.6 \pm 1.02^*$	$1.20 \pm 0.37^{*+}$
Гиперхромные нейроны без сморщивания, %	II слой	4 ± 1.10	$26.4 \pm 1.50^*$	$18 \pm 2.07^{*+}$
	IV слой	3.8 ± 0.66	$12 \pm 3.65^*$	$8.8 \pm 0.86^*$
	V слой	2.4 ± 1.03	$19.4 \pm 2.66^*$	$10.4 \pm 1.96^{*+}$
Нейроны с очаговым хроматолизом, %	II слой	5.6 ± 1.50	$12.6 \pm 3.50^*$	8 ± 1.14
	IV слой	12.8 ± 2.69	$23.4 \pm 3.23^*$	$6.6 \pm 1.63^+$
	V слой	11.2 ± 3.22	$26.4 \pm 6.05^*$	$19.4 \pm 1.08^+$
Нейроны с тотальным хроматолизом, %	II слой	2.6 ± 1.03	5.4 ± 1.81	4.2 ± 1.07
	IV слой	2 ± 0.71	$10.6 \pm 2.44^*$	$6 \pm 0.95^{*+}$
	V слой	2.2 ± 0.86	$7 \pm 1.05^*$	$3.8 \pm 0.86^+$
Пикнотичные перинейральные глиоциты, %	II слой	4.2 ± 0.80	$18.8 \pm 2.63^*$	$9.4 \pm 2.32^{*+}$
	IV слой	3.4 ± 0.51	$12.2 \pm 1.59^*$	$7.8 \pm 0.86^{*+}$
	V слой	3 ± 1.00	7.6 ± 2.06	6.8 ± 1.24
Отечные перинейральные глиоциты, %	II слой	5.6 ± 0.87	$37 \pm 3.41^*$	$23.6 \pm 3.63^{*+}$
	IV слой	7 ± 2.19	$35.6 \pm 5.22^*$	$18.8 \pm 2.82^{*+}$
	V слой	4.8 ± 0.58	$45.6 \pm 1.91^*$	$23.6 \pm 1.86^{*+}$
Численная плотность нейронов в 1 мм ² среза	II слой	2187 ± 107	1854 ± 205	1955 ± 115
	IV слой	2516 ± 208	1751 ± 179	1825 ± 148
	V слой	1605 ± 89	1150 ± 119	1461 ± 159
Численная плотность перинейральной глии в 1 мм ² среза	II слой	327 ± 25	398 ± 20	331 ± 40
	IV слой	346 ± 12	370 ± 22	339 ± 21
	V слой	237 ± 14	256 ± 18	296 ± 31
Глионейрональный индекс	II слой	0.15 ± 0.02	$0.23 \pm 0.032^*$	0.18 ± 0.03
	IV слой	0.14 ± 0.02	$0.22 \pm 0.03^*$	0.19 ± 0.2
	V слой	0.15 ± 0.01	$0.23 \pm 0.03^*$	$0.23 \pm 0.06^*$

Данные представлены как $M \pm SEM$ ($n = 10$). Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), + по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

Таблица 2. Влияние IQ-1S на удельную площадь органелл в цитоплазме нейронов IV слоя сенсомоторной области коры головного мозга крыс OXYS (по данным электронной микроскопии)

Показатель	Вистар	OXYS	OXYS + IQ-1S
Гранулярный ЭПР, %	47.19 ± 2.54	$20.87 \pm 4.98^*$	$33.7 \pm 4.45^{*+}$
Митохондрии, %	14.79 ± 1.86	7.92 ± 1.83	11.48 ± 1.59
Лизосомы, %	1.33 ± 0.20	$13.32 \pm 0.88^*$	$7.70 \pm 1.20^{*+}$
Комплекс Гольджи, %	2.53 ± 0.45	1.55 ± 0.27	2.10 ± 0.21
Вакуоли, %	1.89 ± 0.44	$8.77 \pm 0.62^*$	$6.56 \pm 1.20^*$

Данные представлены как $M \pm SEM$ ($n = 10$). Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), + по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

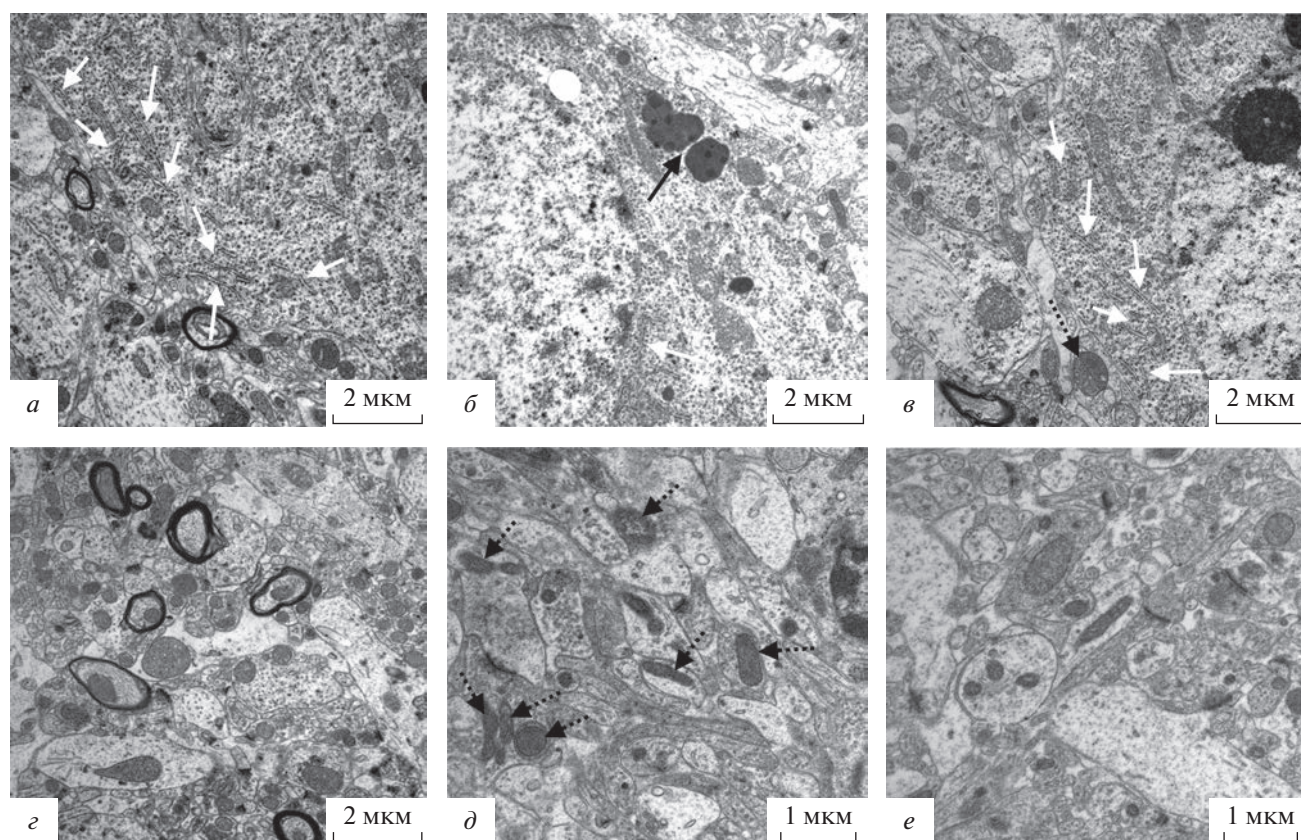


Рис. 2. Тела нейронов (*а, б, в*) и нейропилъ (*г, д, е*) IV слоя коры больших полушарий крыс Вистар (*а, г*), контрольных крыс OXY (*б, д*) и крыс OXY, получавших IQ-1S (*в, е*). Исчезновение цистерн гранулярного ЭПР на большом участке цитоплазмы нейрона контрольной крысы OXY, накопление в ней гранул липофусцина (черная стрелка), появление деструктивно измененных митохондрий с деструкцией матрикса и крист (пунктирные стрелки) в отростках. На фоне приема IQ-1S изменения структуры нейронов менее выражены – гранулярный ЭПР (белые стрелки) и митохондрии в основном имеют нормальное строение.

вали капилляры с признаками частичной окклюзии, свидетельствующие о нарушениях кровотока: с агрегацией форменных элементов крови, стазом и тромбозом мелких сосудов (рис. 3). В результате показатель удельной площади открытых функционирующих сосудов у контрольных крыс OXY оказался в 3 раза меньше, чем у крыс Вистар ($p < 0.001$; рис. 3).

IQ-1S при курсовом введении значительно улучшил состояние микроциркуляции в коре мозга животных, о чем свидетельствует увеличение вдвое удельной площади открытых функционирующих сосудов и снижение удельной площади сосудов с признаками частичной окклюзии в 2.3 раза по сравнению с выявленными у контрольных крыс OXY (рис. 3г). Можно полагать, что с влиянием IQ-1S на микроциркуляцию было связано увеличение сохранности нейронов в мозге животных. IQ-1S существенно улучшил общую картину сенсомоторной коры мозга крыс OXY (рис. 1в, е). У крыс OXY, получавших IQ-1S, доля нейронов с признаками деструктивных изменений снизилась во всех исследованных слоях коры мозга,

однако значений, характерных для крыс Вистар, достигал только показатель процентного содержания нейронов с очаговым хроматолизом (табл. 1). Исследование ультраструктуры нейронов показало, что прием IQ-1S в значительной степени предупредил деструкцию гранулярного ЭПР и митохондрий, дегенеративные изменения последних наблюдались гораздо реже. По сравнению с контролем в опытной группе крыс OXY происходило значимое увеличение удельной площади гранулярной ЭПР и снижение удельной площади лизосом, однако они не достигли значений, выявленных у крыс Вистар. На долю площади, занимаемой в нейронах митохондриями и вакуолями, IQ-1S значимо не повлиял (табл. 2).

IQ-1S при курсовом введении существенно уменьшал деструктивные изменения клеток глии в коре мозга крыс OXY и нормализовал глионейрональный индекс (табл. 1). Количеством мы оценили только перинейрональные глиоциты, находящиеся в тесном контакте с нейронами. На качественном уровне с помощью электронной микроскопии была проведена оценка всех типов

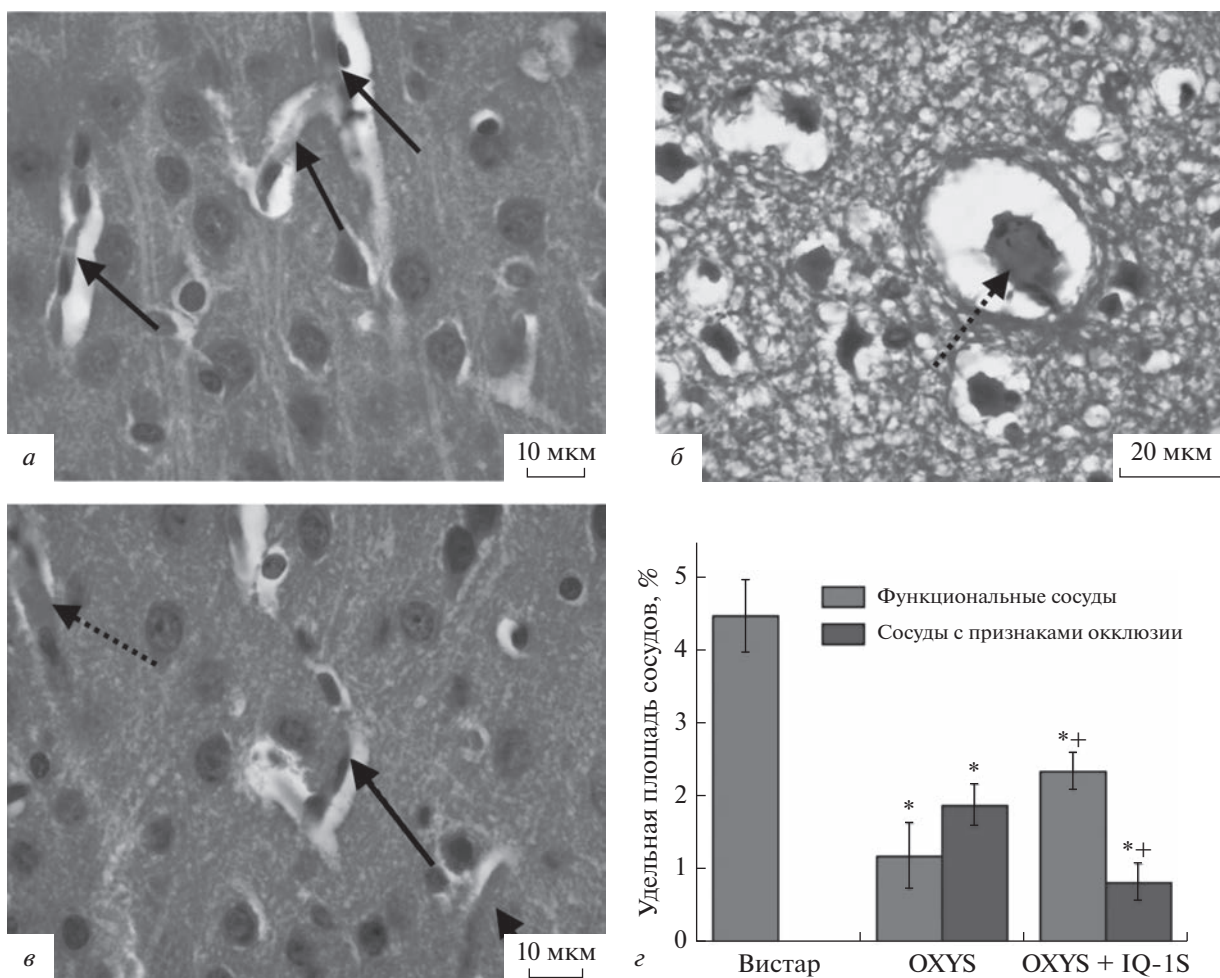


Рис. 3. Влияние IQ-1S на церебральные сосуды крыс OXYS. Репрезентативные фотографии сосудов крыс Вистар (а), OXYS (б) и крыс OXYS, получавших IQ-1S (в). Капилляры у крыс Вистар обычной структуры и кровенаполнения (черные стрелки), тромбоз капилляра с деструкцией эндотелиоцитов, отеком периваскулярного пространства у крысы OXYS (пунктирная стрелка). Прием IQ-1S снижает степень микроциркуляторных нарушений у крыс OXYS. Окраска крезиловым фиолетовым по Нисслю. z – удельная площадь церебральных сосудов. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 10$). Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), + по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

глиальных клеток. При этом в коре мозга контрольных крыс OXYS обращала на себя внимание активация клеток микроглии, накопление в их цитоплазме фагосом (рис. 4). В коре мозга крыс OXYS, получавших IQ-1S, признаки активации микроглии встречались намного реже.

IQ-1S улучшает реологические свойства крови. У крыс OXYS вязкость крови превышала значения данного показателя у крыс Вистар в диапазоне средних ($45\text{--}90\text{ с}^{-1}$) и высоких ($150\text{--}450\text{ с}^{-1}$) скоростей сдвига на 8–12% (рис. 5). К факторам, определяющим вязкость крови, относятся гематокрит, вязкость плазмы (макрореологические показатели), а также агрегация эритроцитов и их деформируемость (микрореологические показатели) [24]. Вязкость плазмы и гематокрит у крыс Вистар и контрольных крыс OXYS не различались,

но при этом индекс деформируемости эритроцитов у крыс OXYS в диапазоне напряжений сдвига 7–20 Па был достоверно на 8–11% ниже, чем у крыс Вистар (табл. 3). Наблюдаемые изменения гемореологических параметров в целом совпадают с ранее полученными данными [16] и свидетельствуют о развитии у крыс OXYS синдрома повышенной вязкости крови, приводящем к снижению эффективности транспорта кислорода кровью. IQ-1S у крыс OXYS не влиял на гематокрит, но при этом снижал содержание фибриногена в плазме крови крыс OXYS на 22%, что отразилось в уменьшении вязкости плазмы на 5% (табл. 3). IQ-1S вызывал увеличение индекса деформируемости эритроцитов относительно контроля на 17–20% (табл. 3), снижал вязкость крови на 11–15% во всем измеренном диапазоне скоростей сдвига и

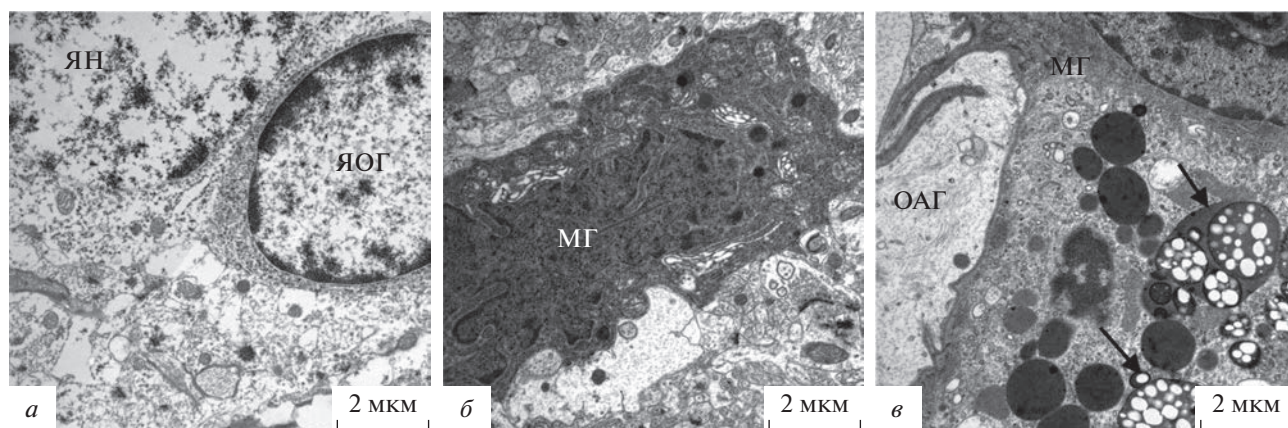


Рис. 4. Примеры изменений клеток глии в коре головного мозга 6-месячных крыс OXYS. *а* – внедрение олигодендрокита в цитоплазму деструктивно измененного нейрона. (ЯОГ – ядро олигодендрокита, ЯН – ядро нейрона). *б* – активированная клетка микроглии (МГ). *в* – фагосомы в цитоплазме клетки микроглии (ОАГ – отросток астроцита).

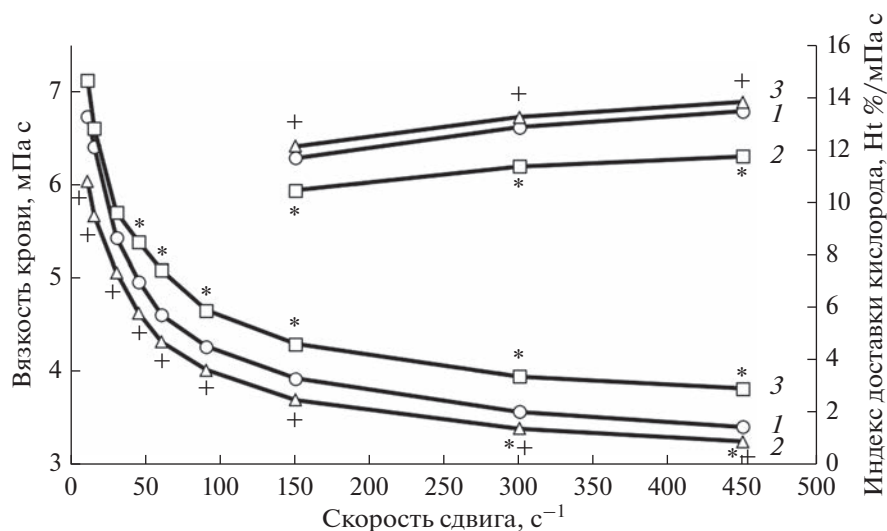


Рис. 5. Влияние IQ-1S на вязкость цельной крови крыс OXYS. 1 – крысы Вистар, 2 – контрольные крысы OXYS, 3 – крысы OXYS, получавшие IQ-1S. Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), + по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

повышал индекс доставки кислорода тканям на 12–17% (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной целью настоящего исследования была оценка профилактического потенциала IQ-1S – нового ингибитора JNK, проявляющего повышенный аффинитет к JNK3, его способности подавлять нейродегенеративные процессы у крыс OXYS на ранней стадии развития признаков БА. Уже в возрасте 3–4 мес. у крыс OXYS выявляются признаки нейродегенеративных изменений: гибель нейронов, синаптическая дисфункция, ги-

перфосфорилирование тау-белка и митохондриальная дисфункция, которые в совокупности приводят к поведенческим изменениям и ухудшению памяти [14, 25]. В то же время накопление амилоида бета происходит позже, чем эти проявления ускоренного старения мозга крыс OXYS, выраженное его увеличение регистрируется в коре мозга и гиппокампе животных в возрасте около 12 мес. [13]. Таким образом, на момент начала эксперимента у крыс OXYS уже присутствовали соответствующие патоморфологические признаки заболевания, а возраст с 4.5 до 6 мес., в течение которого крысы OXYS получали ингибитор JNK3 IQ-1S, может быть условно определен как про-

Таблица 3. Влияние IQ-1S на вязкость плазмы (ВП, мПа с), гематокрит (Ht, %), концентрацию фибриногена в плазме крови (ФГ, г/л) и индекс деформируемости эритроцитов (ИДЭ, отн. ед. при напряжении сдвига 7, 10 и 20 Па) у крыс OXYS

Группа	ВП	Ht	ФГ	ИДЭ		
				7 Па	10 Па	20 Па
Вистар	1.13 ± 0.01	46 ± 1	2.12 ± 0.19	0.393 ± 0.008	0.435 ± 0.005	0.473 ± 0.005
OXYS	1.16 ± 0.01	45 ± 1	2.17 ± 0.17	0.360 ± 0.009*	0.395 ± 0.008*	0.419 ± 0.005*
OXYS + IQ-1S	1.10 ± 0.01 ⁺	45 ± 1	1.71 ± 0.05 ⁺	0.434 ± 0.002* ⁺	0.463 ± 0.004* ⁺	0.496 ± 0.006* ⁺

Данные представлены как $M \pm SEM$ ($n = 5$). Различия достоверны: * по сравнению с крысами Вистар ($p < 0.05$), ⁺ по сравнению с контрольными крысами OXYS ($p < 0.05$).

дромальный период развития признаков БА [26]. Результаты настоящего исследования согласуются с полученными ранее данными. В сенсомоторной коре мозга 6-месячных крыс OXYS мы выявили выраженные нейродегенеративные изменения: усиленную гибель нейронов и признаки активации глии на фоне цереброваскулярных нарушений; нарушения микровакуляризации и микроциркуляции (уменьшение плотности кровеносных сосудов и появление значительного количества микрососудов с признаками частичной окклюзии). В расстройства микроциркуляции вносят вклад нарушения реологических свойств крови: снижение деформируемости эритроцитов, возрастание вязкости плазмы, что в итоге проявляется возрастанием вязкости цельной крови и уменьшением доставки кислорода тканям. Наблюдаемые расстройства реологических свойств крови, микроциркуляции и микровакуляризации в ткани головного мозга крыс OXYS могут приводить к снижению кровотока, к несоответствию между потребностью мозга в кислороде и метаболических субстратах и их поступлением и, как следствие, к дисфункции нейронов [27].

Наши исследования показали, что IQ-1S при курсовом введении в течение полутора мес. ограничил развитие нейродегенеративных процессов в коре мозга крыс OXYS: увеличил долю неизменных нейронов и снизил долю нейронов с признаками деструкции и необратимых повреждений. При этом удельное количество нейронов в коре крыс Вистар и OXYS не различалось. Используемый нами метод не позволяет строго определить механизмы гибели нейронов. В то же время, достоверное уменьшение доли необратимо поврежденных нейронов (гиперхромных нейронов со сморщиванием и нейронов с признаками тотального хроматолиза) свидетельствует о том, что

IQ-1S подавлял гибель нейронов в сенсомоторной коре крыс OXYS [28]. Ранее [29] в префронтальной коре крыс OXYS возрасте 20 дней (на до-симптомной стадии) была выявлена активация апоптоза, которую авторы связали с задержкой созревания головного мозга в OXYS. Также они показали, что прогрессия БА-подобной патологии у крыс OXYS сопровождается активацией как апоптоза, так и некроптоза на фоне угнетения аутофагии и нарушения протеостаза.

Митохондриальная дисфункция считается наиболее вероятной причиной преждевременного старения крыс OXYS. Структурно-функциональные изменения митохондрий в мозге крыс OXYS предшествуют и сопутствуют развитию признаков БА, а воздействия, направленные на восстановление функций митохондрий, подавляют и/или задерживают их развитие [30, 31]. В настоящем исследовании мы выявили в нейронах сенсомоторной коры мозга крыс OXYS существенные нарушения ультраструктуры митохондрий и значительное уменьшение их количества, по сравнению с крысами Вистар. IQ-1S существенно улучшил ультраструктуру митохондрий, но значимо не повлиял на их количество. Также в значительной степени он предупредил деструкцию гранулярного ЭПР и активацию лизосомального аппарата.

В последние годы растет количество аргументов в пользу того, что в патогенезе спорадической формы БА значительную роль играют нарастающие с возрастом изменения глии [32]. Активация глии может предотвращать прогрессию БА, обеспечивая клиренс амилоида бета, в то же время чрезмерная активация глии усиливает его образование и экспрессию провоспалительных цитокинов в головном мозге [33]. Ранее было показано, что у крыс OXYS признаки БА развиваются в условиях снижения интенсивности нейрогенеза в

нейрогенной нише гиппокампа на фоне пониженной плотности астроцитов — при недостаточной глиальной поддержке нейронов, в то время как прогрессия заболевания протекает на фоне реактивного астроглиоза и активации микроглии в гиппокампе [34]. В настоящем исследовании мы не выявили увеличение численной плотности глиоцитов в сенсомоторной коре мозга 6-месячных крыс OXYS, но соотношение клеток глии и нейронов (глионейральный индекс) было повышено, по сравнению с крысами Вистар, во всех исследованных слоях коры, что указывает на активацию глии. При этом на электронномикроскопическом уровне зачастую наблюдались явления фагоцитоза нейронов олигодендроцитами, появление большого количества активированных микроглиоцитов с многочисленными вакуолями и фагосомами в цитоплазме. Как известно, активация микроглии является общим патофизиологическим механизмом развития нейродегенеративных заболеваний и часто происходит параллельно или предшествует активной гибели нейронов [35]. На фоне приема IQ-1S в двух из трех исследованных слоев сенсомоторной коры крыс OXYS глионейральный индекс нормализовался, микроглия становилась менее активной. Ранее были выявлены снижение плотности кровеносных сосудов и их ультраструктурные аномалии в гиппокампе 5-месячных крыс OXYS в период активного проявления признаков БА и значительные цереброваскулярные нарушения — при их прогрессии [15]. Результаты нашего исследования подтвердили, что нарушения церебрального кровотока вносят существенный вклад в развитие нейродегенеративных процессов у крыс OXYS. Также мы показали, что нейротекторный эффект IQ-1S в значительной степени обусловлен существенным улучшением микроциркуляции в коре мозга животных, о чем свидетельствовало увеличение вдвое доли открытых функционирующих сосудов. Очевидно, что на снабжение клеток мозга кислородом у крыс, получавших IQ-1S, позитивно повлияло и ослабление синдрома повышенной вязкости крови за счет улучшения деформируемости эритроцитов, снижения содержания фибриногена и уменьшения вязкости плазмы.

Таким образом, IQ-1S проявил способность улучшать отдельные макро- и микрореологические показатели и снижать таким образом выраженность синдрома повышенной вязкости крови у крыс OXYS. Подобные эффекты IQ-1S ранее продемонстрированы нами на моделях артериальной гипертензии и тотальной транзиторной ишемии головного мозга [36, 37]. Можно предположить, что улучшение реологических свойств крови способно вносить свой вклад в нейропро-

текторный эффект IQ-1S у крыс OXYS. В то же время, очевидно, что эффекты этого ингибитора JNK были системными.

JNK3, ключевая изоформа с-Jun N-терминальной киназы в ЦНС, участвует в развитии мозга, в реализации функций нейронов и реакциях на стрессы, является регулятором сигналов апоптоза [3]. Как отмечалось выше, с чрезмерной активацией JNK3 связывают гибель нейронов при БА, влияет она и на накопление бета амилоида и гиперфосфорилирование тау [4–6]. В то же время нет данных об изменении уровня и активности JNK3 в мозге с возрастом. Ограничением нашего исследования явилось отсутствие оценки как уровня самой JNK3, так и каких-либо ее мишеней, активности JNK-сигнального пути в коре мозга животных и влияния на них IQ-1S. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что увеличение активности сигнального пути JNK вносит вклад в развитие БА, в том числе на ранних стадиях ее развития. Мы полагаем, что применение ингибитора JNK3 IQ-1S может стать перспективной стратегией для профилактики ранних нейродегенеративных нарушений и, возможно, лечения БА. Однако для этого необходимо провести детальное изучение механизмов действия IQ-1S.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам ЦКП “Генофонды лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН за любезно предоставленных животных и сотрудникам лаборатории фармакологии кровообращения НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ О.И. Алиеву, А.М. Анищенко и А.В. Сидехменовой за помощь в проведении гемореологических исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование финансировалось Российским научным фондом, грант № 22-25-00686.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Исследование проводилось в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского совета от 22 сентября 2010 г. и было одобрено Комиссией по биоэтике СибГМУ (Протокол № 4 008/04/06/2022 от 20.06.2022). Томск, Россия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fazio S., Pace D., Maslow K., Zimmerman S., Kallmyer B. // *Gerontologist*. 2018. V. 58. P. 1–9.
2. Cummings J., Lee G., Ritter A., Zhong K. // *Alzheimers Dement.* (NY). 2018. V. 201. P. 195–214.
3. de Los Reyes Corrales T., Losada-Pérez M., Casas-Tintó S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 1–12.
4. Yoon S.O., Park D.J., Ryu J.C., Ozer H.G., Tep C., Shin Y.J., Lim T.H., Pastorino L., Kunwar A.J., Walton J.C., Nagahara A.H., Lu K.P., Nelson R.J., Tuszyński M.H., Huang, K. // *Neuron*. 2012. V. 75. P. 824–837.
5. Yarza R., Vela S., Solas M., Ramirez M.J. // *Front Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 1–12.
6. Qin P., Ran Y., Liu Y., Wei C., Luan X., Niu H., Peng J., Sun J., Wu J. // *Bioorg. Chem.* 2022. V. 128. P. 1–13.
7. Gourmaud S., Paquet C., Dumurgier J., Pace C., Bouras C., Gray F., Laplanche J.L., Meurs E.F., Mouton-Liger F., Hugon J. // *J. Psychiatry Neurosci.* 2015. V. 40. P. 151–161.
8. Jun J., Baek J., Yang S., Moon H., Kim H., Cho H., Hah J.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 1–17.
9. Jun J., Yang S., Lee J., Moon H., Kim J., Jung H., Im D., Oh Y., Jang M., Cho H., Baek J., Kim H., Kang D., Bae H., Tak C., Hwang K., Kwon H., Hah J.M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2023. V. 245. P. 1–16.
10. Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Khlebnikov A.I., Hanks T.S., Kochetkova I., Pascual D.W., Jutila M.A., Quinn M.T. // *Mol. Pharmacol.* 2012. V. 8. P. 832–845.
11. Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Hammaker D., Kochetkova I., Khlebnikov A.I., Lyakhov S.A., Firestein G.S., Quinn M.T. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015. V. 353. P. 505–516.
12. Schepetkin I.A., Khlebnikov A.I., Potapov A.S., Kovrizhina A.R., Matveevskaya V.V., Belyanin M.L., Atochin D.N., Zanoza S.O., Gaidarzhy N.M., Lyakhov S.A., Kirpotina L.N., Quinn M.T. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 161. P. 179–191.
13. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Korbolina E.E., Kiseleva E., Maksimova K.Y., Kolosova N.G. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. P. 1396–1413.
14. Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., Korbolina E.E., Muraleva N.A., Kolosova N.G. // *Cell Cycle*. 2014. V. 13. P. 898–909.
15. Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. // *BMC Genomics*. 2018. V. 19. P. 51–63.
16. Maslov M.Y., Chernysheva G.A., Smol'jakova V.I., Aliev O.I., Kolosova N.G., Plotnikov M.B. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015. V. 60. P. 405–411.
17. Eisenmenger L.B., Peret A., Famakin B.M., Spahic A., Roberts G.S., Bockholt J.H., Johnson K.M., Paulsen J.S. // *Transl. Res.* 2022. V. 22. P. 41–53.
18. Zhdankina A.A., Tikhonov D.I., Logvinov S.V., Plotnikov M.B., Khlebnikov A.I., Kolosova N.G. // *Biomedicines*. 2023. V. 11. P. 1–16.
19. Kolosova N.G., Stefanova N.A., Korbolina E.E., Fursova A., Kozhevnikova O.S. // *Adv. Gerontol.* 2014. V. 27. P. 336–340.
20. Taylor C.R., Rudbeck L. // *Corporation D. Immunohistochemical staining methods*. Sixth edition. ed. Denmark: DAKO Corporation. 2013. P. 1–216.
21. Paxinos G., Watson C. // *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Compact seventh edition. ed. London, United Kingdom; San Diego, C.A.: Elsevier Academic Press. 2018. P. 1–462.
22. Stoltz J.F., Donner M. // *Schweiz. Med. Wochenschr. Suppl.* 1991. V. 43. P. 41–49.
23. Ishida K., Shimizu H., Hida H., Urakawa S., Ida K., Nishino H. // *Neuroscience*. 2004. V. 125. P. 633–644.
24. Alexy T., Detterich J., Connes P., Toth K., Nader E., Kenyeres P., Arriola-Montenegro J., Ulker P., Simmonds M.J. // *Front. Physiol.* 2022. V. 13. P. 1–15.
25. Rudnitskaya E.A., Maksimova K.Y., Muraleva N.A., Logvinov S.V., Yanshole L.V., Kolosova N.G., Stefanova N.A. // *Biogerontology*. 2015. V. 16. P. 303–316.
26. Kolosova N.G., Tyumentsev M.A., Muraleva N.A., Kiseleva E., Vitovtov A.O., Stefanova N.A. // *Curr. Alzheimer Res.* 2017. V. 14. P. 1283–1292.
27. Testud B., Delacour C., El Ahmadi A.A., Brun G., Girard N., Duhamel G., Heesen C., Häußler V., Thaler C., Hasilemek A.C., Stellmann J. P. // *Eur. J. Neurol.* 2022. V. 29. P. 1741–1752.
28. Groves M.J., Scaravilli F. // *Peripheral Neuropathy*. 2005. P. 683–732.
29. Telegina D.V., Suvorov G.K., Kozhevnikova O.S., Kolosova N.G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 1–17.
30. Tyumentsev M.A., Stefanova N.A., Kiseleva E.V., Kolosova N.G. // *Biochemistry*. 2018. V. 83. P. 1083–1088.
31. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Maksimova K.Y., Rudnitskaya E.A., Kiseleva E., Telegina D.V., Kolosova N.G. // *Aging (Albany NY)*. 2016. V. 8. P. 2713–2733.
32. Salas I.H., Burgado J., Allen N.J. // *Neurobiol. Dis.* 2020. V. 143. P. 1–12.
33. Huffs C.M., Middeldorp J., Hol E.M. // *Neurochem. Res.* 2022. P. 1–21.
34. Rudnitskaya E.A., Burnyasheva A.O., Kozlova T.A., Peunov D.A., Kolosova N.G., Stefanova N.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 1–20.
35. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. // *Science*. 2005. V. 308. P. 1314–1318.
36. Plotnikov M.B., Chernysheva G.A., Aliev O.I., Smol'jakova V.I., Fomina T.I., Osipenko A.N., Rydchenko V.S., Anfinogenova Y.J., Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Atochin D.N. // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1–23.
37. Plotnikov M.B., Aliev O.I., Shamanaev A.Y., Sidekhmenova A.V., Anishchenko A.M., Fomina T.I., Rydchenko V.S., Khlebnikov A.I., Anfinogenova Y.J., Schepetkin I.A., Atochin D.N. // *Hypertens. Res.* 2020. V. 43. P. 1068–1078.

JNK (c-Jun N-Terminal Kinase) Inhibitor IQ-1S Suppresses Premature Aging of OXYS Rat Brain

**A. A. Zhdankina^a, A. N. Osipenko^a, D. I. Tikhonov^a, S. V. Logvinov^a,
M. B. Plotnikov^b, A. I. Khlebnikov^c, and N. G. Kolosova^d**

^a *Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

^b *Department of Pharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia*

^c *Kizhner Research Center, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia*

^d *Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

According to the international organization Alzheimer's Disease International (ADI), about 50 million people in the world suffer from Alzheimer's disease (AD). However, there are no effective methods for preventing and slowing down the progression of AD. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway is being discussed as an alternative way to prevent the development of AD and other neurodegenerative diseases. In the present study, we evaluated the ability of a recently synthesized selective JNK3 inhibitor, 11*H*-indeno[1,2-*b*]quinoxalin-11-on oxime sodium (IQ-1S), to suppress neurodegenerative processes in OXYS rats at an early stage of development of signs of AD at the age of 4, 5 to 6 months. Treatment with IQ-1S (50 mg/kg intragastrically) led to the suppression of the development of neurodegenerative processes in the cerebral cortex of OXYS rats: an increase in the proportion of unchanged neurons, a decrease in the proportion of neurons with signs of destruction and irreversible damage, and a normalization of the glioneuronal index, which was facilitated by a decrease in the severity of hyperviscosity syndrome blood in OXYS rats. The use of the JNK3 inhibitor IQ-1S may be a promising strategy for the prevention of early neurodegenerative disorders and, possibly, the treatment of AD.

Keywords: *brain aging, neurodegeneration, OXYS rats, JNK inhibitor, 11*H*-indeno[1,2-*b*]quinoxalin-11-on oxime sodium, hemorheology*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.24

РАЗЛИЧИЯ В ИЗМЕНЕНИЯХ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ГЛУТАМАТ/ГАМК В СЕТЧАТКЕ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ И РАЗВИТИИ РЕТИНОПАТИИ В НОЧНОЕ ВРЕМЯ И ДНЕМ

© 2023 г. Д. В. Телегина¹, *, А. К. Антоненко¹, Н. Г. Колосова¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 27.01.2023 г.

После доработки 16.03.2023 г.

Принята к публикации 20.03.2023 г.

Возраст — ведущий фактор риска развития возрастной макулярной дегенерации (ВМД), которая становится основной причиной потери зрения людьми старше 60 лет. Эффективных способов терапии этого комплексного нейродегенеративного заболевания нет, что обусловлено неполнотой знаний его этиологии и патогенеза. Предполагается, что изменения в сетчатке с возрастом баланса нейромедиаторных систем — глутамата и ГАМК, их десинхронизация, могут быть предпосылкой развития и вносить вклад в прогрессию ВМД. Однако информация об их состоянии в сетчатке при старении, и тем более при развитии ВМД, крайне ограничена. Ранее мы оценили в сетчатке крыс Wistar и преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых развивается ВМД-подобная патология, изменения с возрастом в системе глутамат/ГАМК в дневное время. В настоящей работе мы оценили изменения уровней ферментов синтеза и распада, субъединиц рецепторов и транспортеров этих нейромедиаторов с возрастом в ночное время и сравнили их с выявленными ранее в дневные часы. Выявлены различия в изменениях с возрастом экспрессии компонентов глутамат и ГАМК-ергической системы в ночное время и днем при “здоровом” старении крыс Wistar и при преждевременном — крыс OXYS, связанные, можно полагать, с нарушениями у последних циркадного ритма. Установлено, что прогрессия ВМД-подобной ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне изменений глутаматергической системы в ночное время — повышения уровня глутаминсентатазы, $\gamma 1$ субъединицы рецептора NMDA и снижения уровня транспортера глутамата GLAST, — которые могут способствовать развитию нейродегенеративных изменений в сетчатке. Выраженных изменений ГАМК-ергической системы, которые могли бы вносить заметный вклад в развитие патологического процесса в сетчатке, не выявлено.

Ключевые слова: ГАМК, глутамат, сетчатка, циркадный ритм, старение, возрастная макулярная дегенерация, крысы OXYS

DOI: 10.31857/S1027813323030172, **EDN:** YVFQVJ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВМД — возрастная макулярная дегенерация

РПЭ — ретинальный пигментный эпителий

СХЯ — супрахиазматическое ядро

AMPA — рецептор α -амино-3-гидроксипропионовой кислоты

GABA γ 1 — субъединица $\gamma 1$ ГАМК-рецептора, также известная как GluA1

GABA-T — ГАМК-трансаминаза

GAD67 — изоформа глутамат декарбоксилазы

GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GAT1 — транспортер ГАМК 1

GLAST — глутамат-аспартатный транспортер

NMDA γ 1 — субъединица $\gamma 1$ N-метил-D-аспартатного рецептора

ВВЕДЕНИЕ

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — комплексное нейродегенеративное заболевание сетчатки, которое становится основной причиной потери зрения людьми в возрасте старше 60 лет [1]. Ожидается, что на фоне увеличения продолжительности жизни и постарения населения планеты, к 2040 г. число людей, страдающих ВМД, достигнет 300 млн человек, что приведет к существенными социально-экономическими последствиями [2]. Возраст — основной фактор риска ВМД, в основе патогенеза которой лежат связанные со старением структурно-функциональные изменения

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10; e-mail: telegina@bio-net.nsc.ru.

сетчатки. Молекулярно-генетические предпосылки и механизмы их перехода в патологический процесс остаются неясными, что приводит к тому, что эффективных методов профилактики и лечения ВМД не существует. Предполагается, что изменения в сетчатке с возрастом баланса нейромедиаторных систем — глутамата и ГАМК, их десинхронизация, могут быть предпосылкой развития ВМД и вносить существенный вклад в ее прогрессию [3]. Однако информация об изменениях этих нейромедиаторных систем в сетчатке при старении, и тем более на разных стадиях развития ВМД, крайне ограничена.

Одной из важнейших функций сетчатки является регуляция цикла сна-бодрствования. Сетчатке принадлежит роль ключевого сенсора циркадной системы организма — она опосредует синхронизацию с 24-часовым циклом (фоторегулировку), активируя светочувствительные клетки. Соответственно, для сетчатки характерен ярко выраженный циркадный ритм многих систем, в том числе — нейромедиаторных. В сетчатке, как и в других регионах ЦНС, глутамат — наиболее распространенный возбуждающий нейротрансмиттер. При этом он является биохимическим предшественником наиболее распространенного тормозного нейромедиатора — гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [4]. В сетчатке глутамат и ГАМК не только регулируют зрительный цикл [5], но и опосредуют фоторегулировку и передачу сигнала в вышележащие отделы мозга. Большинство исследований циркадных ритмов этих нейромедиаторов сосредоточено в основном на изучении супрахиазматического ядра гипоталамуса — главного генератора циркадных ритмов у млекопитающих, в то время как данные об изменениях системы ГАМК/глутамат в сетчатке в течение суток при старении практически отсутствуют. Ранее мы провели сравнение изменений с возрастом дневного уровня компонентов системы ГАМК/глутамат в сетчатке крыс Wistar и преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых развивается ретинопатия, по клиническим и морфологическим признакам аналогичная “сухой”, или атрофической форме ВМД у людей [6]. Как показали наши исследования, у крыс OXYS патологическим изменениям подвержены все структурные компоненты сетчатки: сосуды (хориоидальные и интравитреальные) [7], мембрана Бруха, фоторецепторы, ганглионарные нейроны [8], интернейроны и РПЭ [9]. Уже к возрасту ~3–4 мес. у 100% крыс OXYS развиваются клинические проявления ретинопатии [10]. С возрастом патологические изменения нарастают и сопровождаются гибелью фоторецепторов, нарушением аутофагии и активным глиозом [7, 9, 11]. В настоящем исследовании мы оценили в сетчатке крыс Wistar и OXYS изменения глутаматергической и ГАМК-ергической системы с возрастом и при развитии ВМД-подобной патологии в

ночное время и сравнили их с выявленными ранее в дневной период.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовались крысы-самцы линий Wistar (контроль) и OXYS возрастов 20 дней, 3 и 18 мес. (всего 36 животных), соответственно, в период, когда клинические проявления ретинопатии у крыс OXYS отсутствуют, в период их активной манифестации и прогрессии. Животные были получены из центра коллективного пользования “Генофонды лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН. Крыс содержали в стандартных условиях вивария (4–5 самцов в одной пластиковой клетке, наполнитель — опилки) в фиксированном режиме освещенности (цикл 10 ч свет/14 ч темнота, свет включался в 8 ч утра). Животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму (ПК-120-1; ООО “Лабораторснаб”, Москва, Россия) и воде.

Забор и хранение образцов. Забор образцов проводили с 2 до 4 ч ночи при обязательном условии — отсутствии световых волн короче 650–660 нм (красный спектр). Крыс усыпляли смесью углекислого газа, декапитировали, а затем извлекали глаза и помещали их на охлажденную чашку Петри. Глаза очищали от всех посторонних тканей, затем разрезали стерильными инструментами по линии лимба. После удаления передней части глаза и стекловидного тела с внутренней поверхности задней части склеры забирали сетчатку вместе с сосудистой оболочкой и пигментным эпителием. Ткань помещали в пластиковые пробирки и замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при температуре -70°C до момента использования.

Вестерн-блот анализ. Все стадии Вестерн-блот анализа проводили по стандартному протоколу. Белки (30 мкг на дорожку) разделяли с помощью электрофореза на 8%-ном ДСН-ПААГ в Трис-глициновом буфере с pH 8.3 при комнатной температуре, затем переносили на нитроцеллюлозные мембраны. После блокирования в течение 2 ч раствором 5% БСА (№ SLBJ8588V; Sigma-Aldrich, США) в PBS, содержащем 0.1% Твин 20 (PBST), каждую мембрану инкубировали в течение 16 часов с первичными антителами (концентрация 1 : 1000) при температуре 4°C . В работе использованы следующие антитела: против глутаминазы (A0A0G2K1T0, UniProt), глутаминсинтетазы (P15104, UniProt), NMDA1 (P35439, UniProt), AMPA (P19490, UniProt), GAD67 (Q99259-1, UniProt), GABA-T (P80404, UniProt), GABAA1 (P62813, UniProt), GAT1 (P23978, UniProt), GAPDH (P46406, UniProt) и GLAST (P24942, UniProt) (антитела № ab93434, ab64613, ab109182, ab183797, ab26116,

ab152134, ab33299, ab426, ab8245, Abcam, США и № PA5-19709, ThermoFisher, США, соответственно).

Далее проводили инкубацию мембран с соответствующими вторичными антителами (ab97051 и ab6808, Abcam, США) в растворе PBST (1 : 5000) в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего мембрану обрабатывали SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., США) в соответствии с инструкциями производителя.

Детекцию флуоресценции проводили с помощью системы ChemiDoc (ChemiDoc™ MP Imaging System (12003154), Bio-Rad, США). Интенсивность свечения оценивалась с помощью программы ImageJ (NIH, США). Полученные относительные значения концентраций исследуемых белков нормировались на относительные значения концентраций белка GAPDH.

Статистический анализ. Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0. Нормальность распределения проверяли по критерию Шапиро–Уилка. Использовали дисперсионный ANOVA-анализ с последующим сравнением групповых средних по критерию Ньюмана–Кейлса. Как независимые факторы рассматривали “генотип” и “возраст”. Данные представлены как “среднее $\pm$ стандартное отклонение”. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения ферментов, транспортеров и рецепторов глутамата в ночное время. Глутаматергическая передача сигналов имеет решающее значение для восприятия света и регуляции циркадных ритмов. Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером ретино-гипоталамического тракта, с помощью которого световые сигналы от сетчатки передаются главным циркадным часам в супрахиазматических ядрах гипоталамуса [12]. Показано, что эндогенная секреция глутамата в сетчатке подвержена выраженным суточным колебаниям — она возрастает в дневное время и снижается в ночное [13]. В ЦНС суточным колебаниям подвержены также рецепторы, ферменты и транспортеры глутамата [14, 15]. Ранее мы показали, что в дневное время на поздней стадии ВМД-подобной ретинопатии в сетчатке 18-месячных крыс OXYS уровень белка глутаминазы (катализирует превращение глутамина в глутамат) выше, а уровень глутаминсинтетазы (катализирует обратную реакцию, превращение глутамата в глутамин) ниже, чем у одновозрастных крыс Wistar. Такие изменения указывают на то, что в сетчатке крыс OXYS на стадии активной прогрессии ретинопатии соотношение глутамин/глутамат смещено в пользу глутамата [6].

В настоящей работе мы оценили уровень белков глутаминазы и глутаминсинтетазы в сетчатке крыс в ночное время. Как показал ANOVA анализ, ночной уровень белка глутаминсинтетазы, зависел от возраста ($F_{2,28} = 4.41, p < 0.05$), и на него не влиял генотип животных ($F_{1,28} = 2.00, p = 0.17$). При этом только у крыс OXYS уровень глутаминсинтетазы в возрасте 18 мес. был достоверно выше, чем в 3 мес. ($p < 0.05$), и достоверно не изменялся с возрастом у крыс Wistar. На ночной уровень белка глутаминазы не влияли ни возраст, ни генотип крыс (рис. 1).

Таким образом, в ночное время, в отличие от дневного, в сетчатке крыс OXYS уровень глутаминсинтетазы повышался с возраста 3 до 18 мес. При этом уровень глутаминазы с возрастом достоверно не изменялся у крыс обеих линий.

Далее мы исследовали в сетчатке крыс Wistar и OXYS разного возраста ночной уровень ионотропных рецепторов глутамата NMDA и AMPA-типа, ответственных за быструю нейротрансмиссию. Известно, что NMDA рецепторам принадлежит ключевая роль в регуляцию циркадных ритмов [16], а рецепторы AMPA также вносят вклад в световые и циркадные реакции организма [17]. Так, у мышей с нокаутом гена GluA1 (*Gria1^{-/-}*) проявлялись различные циркадные аномалии, в том числе смещенные, фрагментированные и более изменчивые паттерны отдыха–активности [18].

В настоящем исследовании мы проанализировали содержание в сетчатке животных разного возраста субъединицу GluA1 рецептора AMPA и субъединицу NR1 рецептора NMDA (NMDAr1; также известна как GluN1). Как показал факторный ANOVA анализ, на ночной уровень белка NMDAr1 влияли факторы “генотип” ($F_{1,24} = 7.82, p < 0.05$) и “возраст” ($F_{2,24} = 3.59, p < 0.05$). Однако с возрастом уровень NMDAr1 изменялся только у крыс OXYS — в возрасте 18 мес. он был достоверно выше, чем в 20 дней ($p < 0.01$). Достоверные различия между линиями обнаружены в возрасте 18 мес.: уровень NMDAr1 у крыс OXYS в ночное время был достоверно выше, чем у крыс Wistar (рис. 2). Уровень белка GluA1 в ночное время не зависел от генотипа животных ($F_{1,28} = 0.7285, p > 0.05$), но на него влиял возраст ($F_{2,28} = 15.44, p < 0.001$): к 18 мес. уровень GluA1 увеличивался в сетчатке у крыс обеих линий ($p < 0.05$) (рис. 1).

Таким образом, тенденция изменений уровня рецептора NMDAr1 у крыс OXYS в ночное время отличается от выявленной в дневное: как мы показали ранее, дневной уровень белка NMDAr1 в сетчатке крыс OXYS был таким же, как у крыс Wistar, и не изменялся с возрастом [6]. Ранее было показано, что экспрессия рецептора NMDA в различных отделах мозга подвержена суточным колебаниям [14]. Выявленное нами увеличение с возрастом ночного уровня NMDAr1 у крыс OXYS,

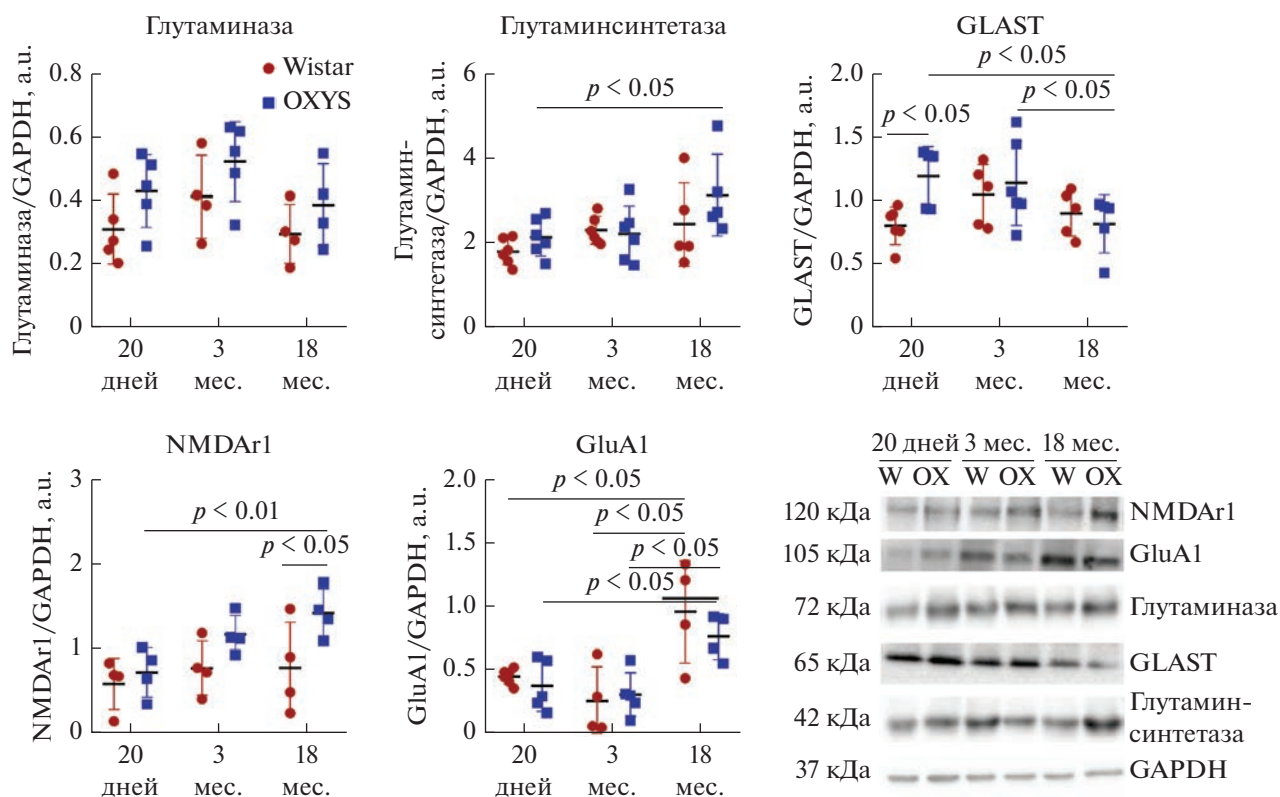


Рис. 1. Уровни белков глутаминазы, глутаминсинтетазы, GLAST, NMDA1 и GluA1 в сетчатке крыс OXYS и Wistar в ночное время. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение; * $p < 0.05$ для межлинейных и межвозрастных различий. $n = 4-6$ животных в группе. Условные обозначения: W – Wistar, OX – OXYS.

можно полагать, указывает на сглаживание суточной динамики экспрессии этого белка на поздних стадиях ВМД-подобной патологии. Характер изменений с возрастом уровня GluA1 в ночное время в сетчатке крыс обеих линий отличался от такового в дневные часы [6]. Повышение уровня GluA1 скорее всего связано с возрастзависимым изменением циркадных ритмов [19, 20].

Важно отметить, что сигнальный каскад рецепторов NMDA способен опосредовать как эксайтотоксические эффекты глутамата [21], так и запускать нейропротекторные механизмы [3]. Важную роль в определении направленности эффектов глутамата играет локализация и субъединичный состав рецепторов. Так, активация внесинаптических рецепторов NMDA может инициировать дегенеративные каскады, тогда как активация синаптических рецепторов NMDA приводит к запуску нейропротекторных механизмов [22]. Таким образом, увеличение уровня белка NMDA1 в сетчатке крыс OXYS с возрастом в ночное время может быть связано как с запуском эксайтотоксичности, так и с активацией компенсаторных механизмов в сетчатке.

Важным фактором, определяющим доступность глутамата для сигнальных процессов, является си-

стема его обратного захвата и рециркуляции, которая необходима для поддержания низких, нетоксичных концентраций этого нейромедиатора. Клетки Мюллера регулируют концентрацию внеклеточного глутамата в сетчатке с помощью высокоаффинных электрогенных транспортеров, основным из них является переносчик глутамата-аспартата GLAST [23], который также подвержен суточным ритмам [15].

В этой работе анализ результатов исследования уровня транспортера GLAST в сетчатке в ночное время выявил некоторое влияние на него фактора “возраст” – на уровне тенденции ($F_{2,32} = 2.57$, $p = 0.09$). Также на уровне тенденции факторы “возраст” и “генотип” взаимодействовали ($F_{2,32} = 2.72$, $p = 0.08$). К возрасту 18 мес. в сетчатке крыс OXYS наблюдалось достоверное снижение уровня белка GLAST ($p < 0.05$ по сравнению с возрастными 20 дней и 3 мес.). В сетчатке крыс Wistar этот показатель с возрастом не менялся. Достоверные межлинейные различия выявлены только в сетчатке 20-дневных животных – у крыс OXYS уровень белка GLAST был выше, чем у крыс Wistar ($p < 0.05$) (рис. 2). Примечательно, что в дневное время уровень транспортера глутамата GLAST в сетчатке крыс OXYS снижался по мере развития

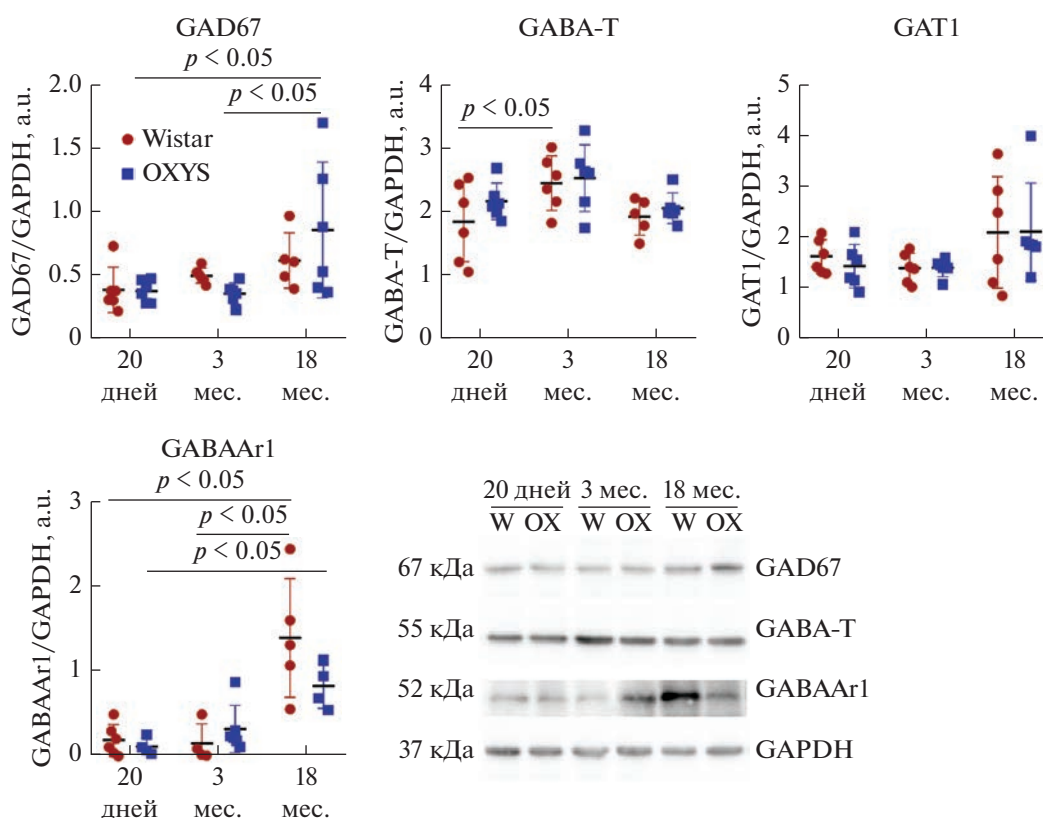


Рис. 2. Уровни белков GAD67, GABA-T, GAT1 и GABAAR1 в сетчатке крыс OXYS и Wistar в ночное время. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение; * $p < 0.05$ для межлинейных и межвозрастных различий. $n = 4-6$ животных в группе. Условные обозначения: W – Wistar, OX – OXYS.

ВМД-подобной ретинопатии [6]. Мы полагаем, что различия в тенденциях изменений уровня GLAST в дневное и ночное время указывают на нарушение суточных колебаний экспрессии этого транспортера у крыс OXYS на стадии активной прогрессии ретинопатии и связаны с развитием реактивного глиоза, характерного для поздних стадий ВМД [9]. Глиоз приводит к рестрикции отростков, которая, в свою очередь, также влияет на обратный захват глутамата астроцитами [24, 25]. Так, показано, что при рестрикции отростков астроцитов обратный захват глутамата из синаптического щели менее эффективен из-за увеличения расстояния между окончаниями астроцитов и нейронов, что приводит к повышению внеклеточной концентрации глутамата [26].

Исследование возрастных изменений ГАМК-ергической системы в сетчатке крыс Wistar и OXYS в ночное время. ГАМК является основным тормозным нейромедиатором в ЦНС, уровень которого, как и глутамата, подвержен циркадным колебаниям во всех исследованных отделах мозга. Так, в исследовании на крысах показано, что для ГАМК и некоторых компонентов ГАМК-ергической системы характерно повышение в ночное время и снижение в дневное в СХЯ, гипоталамусе и мосте

[14]. В сетчатке хомячков Jaliffa и соавторы [27] также выявили достоверное увеличение уровня ГАМК ночью и снижение днем, тогда как у крыс, по данным [13], при наличии аналогичных суточных колебаний достоверных различий уровня ГАМК выявлено не было. Ранее при оценке уровня белков ГАМК-ергической системы (GAD67, GABA-T и GAT1) в сетчатке крыс OXYS и Wistar разного возраста в дневное время мы выявили их повышение к возрасту 3 мес. и снижение – к возрасту 18 мес. [6]. При этом содержание белка рецептора ГАМК A альфа 1 (GABAAR1) было у крыс OXYS ниже, чем у Wistar, наиболее существенными различия были выявлены в сетчатке 18-месячных крыс OXYS с выраженными проявлениями ретинопатии [6].

В настоящей работе проведено исследование этих параметров в ночное время суток, которое выявило сходную тенденцию изменений с возрастом ферментов, катализирующих синтез (GAD67) и распад (GABA-T) ГАМК: анализ ANOVA выявил влияние фактора “возраст” ($F_{2,35} = 6.55$, $p < 0.01$ для 16GAD67 и $F_{2,35} = 5.24$, $p < 0.05$ для GABA-T), при этом фактор “генотип” не влиял на уровень этих белков. Уровень фермента GAD67 повышался к возрасту 18 мес. у крыс обеих линий, но толь-

Таблица 1. Сравнение изменений с возрастом уровня исследованных белков системы ГАМК/глутамат в сетчатке крыс Wistar и OXYS в дневное из [6] и ночное время. Условные обозначения: NA — нет различий, UP — повышение уровня; DOWN — понижение уровня

	Wistar				OXYS			
	20 дней—3 месяца		3 месяца—18 месяцев		20 дней—3 месяца		3 месяца—18 месяцев	
Белок	День	Ночь	День	Ночь	День	Ночь	День	Ночь
Глутаминаза	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Глутаминсинтетаза	NA	NA	UP	NA	NA	NA	NA	UP
GLAST	UP	NA	UP	NA	UP	NA	UP	DOWN
NMDAR1	NA	NA	NA	NA	NA	UP	NA	UP
GluA1	DOWN	NA	NA	UP	NA	NA	NA	UP
GAD67	UP	NA	DOWN	NA	UP	NA	DOWN	UP
GABA-T	UP	UP	NA	NA	UP	NA	NA	NA
GAT1	UP		DOWN	NA	UP	NA	DOWN	NA
GABAAM	NA	NA	NA	UP	NA	NA	NA	UP

ко у крыс OXYS различия между его уровнем в возрасте 3 и 18 мес. были достоверными ($p < 0.05$). Уровень фермента GABA-T в ночное время достоверно изменялся с возрастом только в сетчатке крыс Wistar — повышался к возрасту 3 мес. ($p < 0.05$) и оставался на этом уровне в 18 мес. Содержание транспортера GAT1 (удаляет ГАМК из синаптической щели) в ночное время с возрастом не изменялось и не зависело от генотипа животных. Содержание в ночное время в сетчатке белка GABAAR1 — ионотропного рецептора и лиганд-управляемого ионного канала — изменялось с возрастом ($F_{2,28} = 20.33$, $p < 0.001$) — к 18 мес. его уровень достоверно увеличивался у крыс обеих линий ($p < 0.05$). При этом межлинейных различий в содержании GABAAR1 выявлено не было (рис. 2).

Таким образом, как и в случае с компонентами глутаматергической системы, мы наблюдаем различия в тенденциях изменений с возрастом дневного и ночного уровней компонентов ГАМК-ергической системы в сетчатке крыс, что, скорее всего, связано с суточной динамикой изменения экспрессии и активности. Стоит также отметить, что в ночное время не обнаружено достоверных различий уровня исследуемых белков между линиями, а в дневное время выявлены достоверные различия лишь в уровне рецептора GABAAR1. Результаты подтверждают гипотезу о том, что развитие ВМД-подобной ретинопатии сопровождается изменениями компонентов в основном в глутаматергической системе и эти изменения связаны с нарушением циркадного ритма, характерного для крыс OXYS (табл. 1).

Таким образом, мы показали, что динамика изменений с возрастом исследованных параметров системы глутамат/ГАМК в ночные часы отличается от таковой в дневные — исследованной нами ранее [6]. В табл. 1 приведены обобщенные результаты сравнения направленности изменений. Как видим, с возраста 20 дней до 3 мес. в сетчатке крыс обеих линий изменился — вырос — ночной уровень только одного параметра — GABA-T — у крыс Wistar и NMDAR1 — у OXYS. При этом у крыс обеих линий однонаправленно изменился дневной уровень четырех из девяти исследованных параметров (GLAST, GAD67, GABA-T и GAT1), и только у крыс Wistar снизился уровень GluA1. В возрасте 18 мес. как у крыс Wistar, так и у OXYS дневной уровень GAD67 и GAT1 был ниже, а уровень GLAST — выше, чем в возрасте 3 мес., и только у крыс Wistar вырос уровень глутаминсинтетазы. При этом в ночное время у крыс выявлено изменение только двух параметров — увеличение уровня GluA1 и GABAAR1. У крыс OXYS с возраста 3 до 18 мес. ночной уровень GluA1 и GABAAR1 также вырос, но при этом также увеличилось содержание глутаминсинтетазы, NMDAR1 и GAD67 и снизилось — GLAST. Таким образом, наиболее существенно в сетчатке крыс OXYS изменялись с возрастом и отличались от крыс компоненты глутаматергической системы.

Выявленные нами различия в тенденции изменений с возрастом компонентов глутамат и ГАМК-ергических систем в ночное время по сравнению с дневным, можно полагать, связаны с нарушениями циркадного ритма у крыс OXYS. В пользу такого предположения свидетельствуют полученные нами ранее результаты исследования суточных ритмов основного регулятора циркад-

ных ритмов мелатонина, содержание которого в плазме крови крыс OXYS, начиная с возраста 3 мес., не различался в дневное и ночное время [28]. Следует отметить, что нарушения циркадных ритмов, в том числе цикла выработки мелатонина, были выявлены непосредственно в сетчатке пациентов с ВМД [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сбалансированное взаимодействие медиаторных систем глутамата и ГАМК контролирует многие процессы в ЦНС, а их дисбаланс может способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний, в том числе в сетчатке. Информация об изменениях содержания ферментов синтеза и распада глутамата и ГАМК в сетчатке при старении и развитии ВМД крайне ограничена. Проведено исследование изменений содержания этих ферментов в сетчатке с возрастом, выявлены отличия его изменений в ночное время и днем при “здоровом” старении крыс Wistar и при преждевременном — крыс OXYS, у которых развивается ВМД-подобная ретинопатия. Установлено, что прогрессия ВМД-подобной ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне изменений глутаматергической системы в ночное время — повышение уровня глутаминсентазы, r1 субъединицы рецептора NMDA и снижение уровня транспортера глутамата GLAST — которые могут способствовать развитию нейродегенеративных изменений в сетчатке. В то же время у крыс OXYS не выявлено выраженных изменений ГАМК-ергической системы, которые могли бы вносить заметный вклад в развитие патологического процесса в сетчатке.

БЛАГОДАРНОСТИ

Животные предоставлены ЦКП Генофонды лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-75-00029.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследования одобрены этическим комитетом Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия; № 34 от 15 июня 2016 г.).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *García-Layana A., Cabrera-López F., García-Arumí J., Arias-Barquet L., Ruiz-Moreno J.M.* // Clin. Interv in Aging. 2017. V. 12. P. 1579–1587.
2. *Mitchell P., Liew G., Gopinath B., Wong T.Y.* // Lancet. 2018. V. 392. P. 1147–1159.
3. *Boccuni I., Fairless R.* // Life. 2022. V. 12. P. 638.
4. *Armada-Moreira A., Gomes J.I., Pina C.C., Savchak O.K., Gonçalves-Ribeiro J., Rei N., Pinto S., Morais T.P., Martins R.S., Ribeiro F.F., Sebastião A.M., Crunelli V., Vaz S.H.* // Front. Cell Neurosci. V. 14. P. 90.
5. *Salesse C.* // Journal Francais D’ophtalmologie. 2017. V. 40. P. 239–250.
6. *Telegina D.V., Antonenko A.K., Fursova A.Z., Kolosova N.G.* // Biogerontology. 2022. V. 23. P. 571–585.
7. *Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Markovets A.M., Telegina D.V., Muraleva N.A., Kolosova N.G.* // Advances in Gerontology. 2018. V. 31. № 3. P. 339–344.
8. *Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Kolosova N.G.* // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. № 9. P. 1009–1017.
9. *Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Bayborodin S.I., Kolosova N.G.* // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 1–11.
10. *Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S., Muraleva N.A., Rudnitskaya E.A., Rumyantseva Y.V., Stefanova N.A., Telegina D.V., Tyumentsev M.A., Fursova A.Z.* // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. P. 1552–1562.
11. *Kozhevnikova O.S., Telegina D.V., Tyumentsev M.A., Kolosova N.G.* // International Journal of Molecular Sciences. 2019. V. 20. № 19. P. 4804.
12. *Colwell C.S.* // Nat. Rev. Neurosci. 2011. V. 12. P. 553–569.
13. *Pozdeyev N.V., Doroshenko E.M., Lavrikova E.V., Ettingof R.N.* // J. Biol. Rhythms. 2000. V. 15 № 2. P. 112–121.
14. *Estrada-Rojo F., Escobar C., Navarro L.* // Revista mexicana de neurociencia. 2020. V. 21. № 1. P. 31–38.
15. *Chi-Castañeda D., Ortega A.* // Frontiers in Endocrinology. 2018. V. 9. P. 340.
16. *Michel S., Itri J., Colwell C.S.* // Journal of Neurophysiology. 2002. V. 88. № 2. P. 817–828.
17. *Mizoro Y., Yamaguchi Y., Kitazawa R., Yamada H., Matsuo M., Fustin J.M., Doi M., Okamura H.* // PLoS One. 2010. V. 5. № 6. e10951.
18. *Ang G., Brown L.A., Tam S.K.E., Davies K.E., Foster R.G., Harrison P.J., Sprengel R., Vyazovskiy V.V., Oliver P.L., Bannerman D.M., Peirson S.N.* // Translational Psychiatry. 2021. V. 11. № 1. P. 1–17.
19. *Biello S.M., Bonsall D.R., Atkinson L.A., Molyneux P.C., Harrington M.E., Lall G.S.* // Neurobiology of Aging. 2018. V. 66. P. 75–84.
20. *Steponenaite A., Biello S.M., Lall G.S.* // Aging (Albany NY). 2018. V. 10. № 11. P. 3065.
21. *Wang R., Reddy P.H.* // Journal of Alzheimer’s Disease. 2017. V. 57. № 4. P. 1041–1048.

22. *Hardingham G.E., Bading H.* // *Nature Reviews Neuroscience*. 2010. V. 11. № 10. P. 682–696.
23. *Pfeiffer R.L., Marc R.E., Jones B.W.* // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2020. V. 31. № 4. P. 320–329.
24. *Sun D., Jakobs T.C.* // *The Neuroscientist*. 2012. V. 18. № 6. P. 567–588.
25. *Brécier A., Li V.W., Smith C.S., Halievski K., Ghasemlou N.* // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2022.
26. *McCauley J.P., Petroccione M.A., D'Brant L.Y., Todd G.C., Affinnih N., Wisnoski J.J., Zahid S., Shree S., Sousa A.A., De Guzman R.M., Migliore R., Brazhe A., Leapman R.D., Khmaladze A., Semyanov A., Zuloaga D.G., Migliore M., Scimemi A.* // *Cell Reports*. 2020. V. 33. № 2. P. 108255.
27. *Jaliffa C.O., Saenz D., Resnik E., Keller Sarmiento M.I., Rosenstein R.E.* // *Brain Res*. 2001. V. 912. P. 195–202.
28. *Rudnitskaya E.A., Maksimova K.Y., Muraleva N.A., Logvinov S.V., Yanshole L.V., Kolosova N.G., Stefanova N.A.* // *Biogerontology*. 2015. V. 16. № 3. P. 303–316.
29. *Vallée A., Lecarpentier Y., Vallée R., Guillevin R., Vallée J.-N.* // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21. № 3. P. 820.

Differences in Changes in the Glutamate/GABA System Activity in the Rat Retina during Aging and the Development of Retinopathy at Nighttime and Daytime

D. V. Telegina^a, A. K. Antonenko^a, and N. G. Kolosova^a

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

Age is a leading risk factor for the development of age-related macular degeneration (AMD), which is the cause of vision loss in elderly. There are no effective methods of therapy for this complex neurodegenerative disease due to the incomplete knowledge of its etiology and pathogenesis. It is assumed that development of aging imbalance of neurotransmitter systems (glutamate, GABA) in the retina, their desynchronization, may be a precondition for the development progression of AMD. Information about their state in the retina during aging, and especially development of AMD, is extremely limited. We previously assessed age-related changes in the daytime glutamate/GABA system in the retinas of Wistar and senescence-accelerated OXYS rats that develop AMD-like pathology. Here, we evaluated aging changes in the synthesis and degradation enzymes, receptor subunits, and transporters of these neurotransmitters at nighttime and compared them with detected earlier in the daytime. Differences in age-related changes in the expression of the components of the glutamate and GABAergic systems at night and daytime were revealed during “healthy” aging in Wistar rats and during premature aging in OXYS rats. This may be due to disruption of the circadian rhythm. It is established that the progression of AMD-like retinopathy in OXYS rats occurs against the background of changes in the glutamatergic system at the nighttime (increased of glutamine synthetase, NMDAR1 level and decreased GLAST level), which facilitate the retinal neurodegenerative changes. Pronounced changes in the GABAergic system, which could make a significant contribution to the development of the pathological process were not identified.

Keywords: GABA, glutamate, retina, circadian rhythm, aging, age-related macular degeneration, OXYS rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 612.82:571.27:577.25

БЫСТРЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ АКТИВНОЙ КАСПАЗЫ-3 И РЕЦЕПТОРОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КЛЕТКАХ СТРИАТУМА ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ

© 2023 г. В. В. Булыгина¹ *, Г. Т. Шишкина¹, Д. А. Ланшаков¹, Т. С. Калинина¹,
Н. П. Комышева¹, У. С. Дрозд¹, Е. В. Сухарева¹, Н. Н. Дыгало¹

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

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.

После доработки 01.03.2023 г.

Принята к публикации 10.03.2023 г.

Активация микроглии — резидентных иммунных клеток центральной нервной системы, играет ключевую роль в патогенезе неврологических расстройств, индуцированных инфекциями, а также травматическими и ишемическими событиями. Понимание ответов клеток мозга, прежде всего, микроглиальных, на повреждающие воздействия может способствовать преодолению их патологических последствий. В данной работе анализировали клеточные эффекты бактериального липополисахарида (ЛПС), широко используемого в качестве провоспалительного стимула. Введение ЛПС в область правого стриатума крыс вызывало через сутки выраженный неврологический дефицит, которому в области введения ЛПС сопутствовали: увеличение числа микроглиальных клеток, повышение плотности глюкокортикоидных рецепторов (ГР) и их транслокация в ядра клеток, коэкспрессирующих исполнительную протеазу апоптоза активную каспазу-3 и ГР. Результаты свидетельствуют об острых изменениях активности микроглиальных клеток, а также экспрессии и функциональной активности ГР в ответ на бактериальный эндотоксин. Дальнейшее выяснение функциональной роли активной каспазы-3 и ГР в микроглиальных клетках на фоне провоспалительной активации может помочь в определении мишеней для ослабления симптомов неврологического расстройства.

Ключевые слова: стриатум, липополисахарид, микроглия, активная каспаза-3, глюкокортикоидные рецепторы, неврологический дефицит

DOI: 10.31857/S102781332303007X, **EDN:** YURFGY

ВВЕДЕНИЕ

Нейровоспаление связывают с патогенезом многих неврологических расстройств, сопровождающих, например, болезни Альцгеймера [1] и Паркинсона [2], а также травматические [3] и ишемические [4, 5] повреждения мозга. В основе инициации нейровоспаления лежит активация микроглиальных клеток — резидентных макрофагов центральной нервной системы [6]. Глюкокортикоиды, гормоны гипоталамо-гипофизарно-адреноренальной системы, могут оказывать влияние на выраженность нейровоспаления, причем, помимо считающегося классическим противовоспалительного действия, они могут его и увеличивать [7]. Введение кортикостерона взрослым самцам крыс усиливало нейровоспаление и усугубляло вызванную каиновой кислотой гибель нейронов гиппокампа [8].

Конкретный ответ нейровоспаления на глюкокортикоиды может зависеть от числа глюкокортикоидных рецепторов (ГР), в том числе и в микроглиальных клетках. На такую возможность указывают результаты, полученные на нокаутах по этим рецепторам. У мышей с отсутствием ГР в макрофагах, внутримозговое введение липополисахарида (ЛПС) приводило через сутки к более выраженному нейровоспалению и повреждению нейронов и аксонов [9]. Сходный эффект на ответ к системному введению ЛПС оказывало и общее угнетение ГР антагонистом рецепторов у нормальных животных [9].

Недавно, однако, обнаружено увеличение экспрессии и ядерной транслокации ГР в гиппокампе крысы при применении нейропептида апелина, угнетающего активацию микроглии и, следовательно, нейровоспаления [10]. Влияние глюкокортикоидов на нейровоспаление может зависеть от изменения экспрессии ГР под влиянием иммунной активации, однако такая зависимость остается

* Адресат для корреспонденции: 630090 Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 10; e-mail: veta@bionet.nsc.ru.

пока не вполне ясной. С целью дальнейшего прояснения этого вопроса в работе исследовали экспрессию ГР, а также исполнительную протеазу апоптоза активной каспазы-3 в областях стриатума в условиях прямой активации микроглиальных клеток введением ЛПС в мозг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовали взрослых самцов крыс линии Wistar, весом 200–250 г, которые содержались в виварии ИЦиГ СО РАН в условиях контролируемого светового режима (14 ч свет/10 ч темнота) со свободным доступом к воде и корму. Все процедуры с экспериментальными животными проводили в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейской комиссии, а также приказом 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики” Министерства Здравоохранения РФ, и были одобрены биоэтической комиссией ИЦиГ СО РАН – Протокол № 115 от 20 декабря 2021 г.

Индукция нейровоспаления. Нейровоспаление вызывали липополисахаридом из *Escherichia coli* (серотип O55:B5) (Sigma-Aldrich, США; L2880), 30 мкг которого в 4 мкл физиологического раствора, как и ранее [11], вводили стереотаксически в область правого стриатума (AP = +0.5 мм, ML = +3 мм, DV = –4.5 мм; [12]) под изофлурановой анестезией в течение 5 мин. Контрольным животным в аналогичных условиях вводили 4 мкл физиологического раствора (физ. р-р).

Через сутки после введения препаратов, животных тестировали на наличие неврологического дефицита (10 животных в группе) и собирали образцы правого и левого стриатума для молекулярных (по 7–8 животных в группе) и иммуногистохимических исследований (минимум 4 животных в группе).

Тестирование на неврологический дефицит. Выбранные тесты Гарсия [13] и тест вытягивания лап с обеих сторон (Placing test) [14] позволяют с помощью соответствующей бальной шкалы количественно оценить неврологический дефицит и расстройства двигательной активности передних конечностей [14–16]. В тесте Гарсия [13, 17] анализировали расстройства двигательной и чувствительной сфер, а также координации движений (три балла за каждое удачно выполненное испытание в шести отдельных под-тестах; максимальное количество баллов – 18). В “Placing test” подсчитывали количество подъемов крысой передних лап, свисающих без опоры, в 10 попытках для каждой лапы.

Анализ уровня мРНК ГР методом ОТ-ПЦР. Суммарную РНК из образцов стриатума правого и левого полушарий выделяли одностадийным гуанидин-изотиоцианатным методом, как описа-

но нами ранее [18]. Синтез кДНК проводили из 3 мкг суммарной РНК с применением Oligo(dT) и ревертазы М-MuLV (“СибЭнзим”, Россия) в течение 90 мин при 42°C. Количественный анализ содержания мРНК ГР относительно мРНК гена домашнего хозяйства бета-актина проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays (Nr3c1: Rn00561369_m1; actb: Rn00667869_m1; Thermo Fisher Scientific, USA) на амплификаторе VIIA™ 7 (Thermo Fisher Scientific, USA) и рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$.

Иммуногистохимия. У животных после последовательного транскардиального перфузирования (под авертиновым наркозом) 0.02 М фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4% раствором параформальдегида в 0.02 М PBS извлекали мозг и помещали в такой же фиксатор на 4 ч, а затем в 30% сахарозу в 0.02 М PBS для криопротекции. Ткань замораживали при –80°C и делали коронарные срезы толщиной 20 мкм на криотоме Microtome HM 550 (Германия), которые собирали на адгезивные стекла Superfrost plus (Термо, США). Перед иммунофлуоресцентной реакцией срезы высушивали ночь при комнатной температуре. Затем срезы промывали 2 раза по 10 мин в 0.02 М PBS с 0.2% Triton X-100 (PBST). Неспецифическое связывание блокировали в 1.5% BSA в PBST. Использовали специфичные первичные антитела в разведении 1 : 200 кролика против активной каспазы-3 (Cleaved Caspase-3; AB 9664, Cell Signalling, США), осли против маркера микроглии Iba-1 (ab 5076, Abcam, США, кролика против глюкокортикоидных рецепторов (sc-8992 H-300, Santa Cruz Biotechnology, США). Коэкспрессию активной каспазы-3 в микроглиальных клетках оценивали, используя соответствующую пару первичных антител, иммунофлуоресцентную реакцию для определения уровня глюкокортикоидных рецепторов проводили на отдельной серии стекол. Вторичными антителами (в разведении 1 : 350) были Ig осли против IgG козы, конъюгированные с Alexa-488 (705-546-147 F(ab)2, JacksonImmunoResearch, США), Ig осли против IgG кролика, конъюгированные с Cy3 (711-166-152 F(ab)2, Jackson Immuno Research, США), Ig осли против IgG кролика, конъюгированные с Alexa-488 (711-546-152 F(ab)2, JacksonImmunoResearch, США). Специфичность каждой иммунофлуоресцентной реакции проверяли с помощью отрицательного контроля (отсутствие первичных или вторичных антител).

Микрофотосъемки стриатума проводили на конфокальном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss, Германия), при панорамной съемке срезов для последующей статобработки использовали увеличение 20X и безиммерсионный объектив Plan-Apochromat 20X/0,8 M27, репрезентативные микрофотографии получены на конфокальном микроскопе LSM 510 (Carl Zeiss, Германия), увеличение 63X,

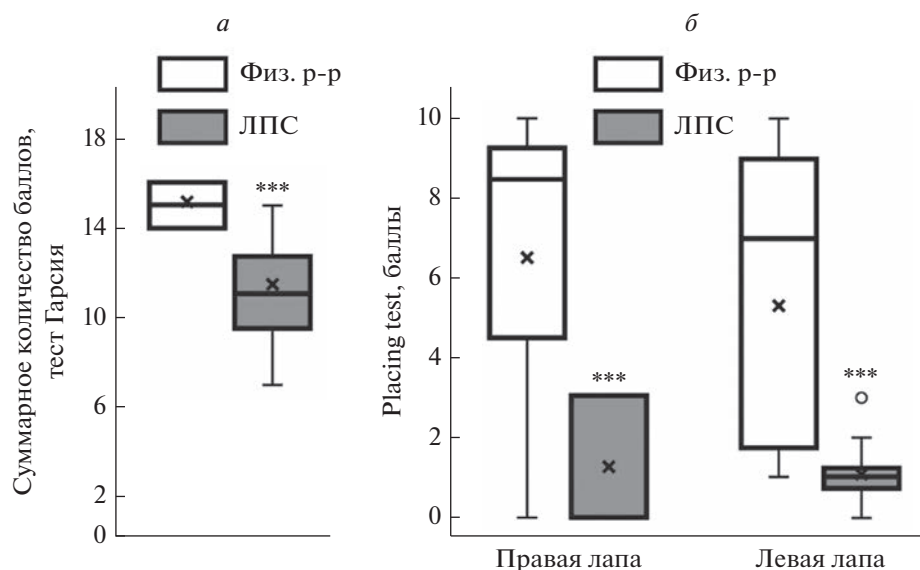


Рис. 1. Проявления неврологического дефицита через сутки после введения ЛПС в область правого стриатума. Данные представлены в виде диаграммы размаха (“ящик с усами”). Горизонтальная линия — медиана, размах усов соответствует доверительному интервалу. Белый столбик — группа с введением физиологического раствора (физ. р-р), серый столбик — группа с введением ЛПС (ЛПС). *а* — суммарное количество баллов по тесту Гарсия, *** $p < 0.001$ по сравнению со всеми группами; *б* — суммарное количество баллов по Placing Test, *** $p < 0.001$ по сравнению со всеми группами.

масляный объектив Plan-Apochromat 63X/1,4 Oil DiC. Количество клеток на 1 мм^2 среза мозга, экспрессирующих ГР, активную каспазу-3, Iba-1 и коэкспрессирующих Iba-1 и каспазу-3 подсчитывали с помощью программы QuPath-0.2.3 [19], по меньшей мере по 7 срезов от каждой крысы было сфотографировано и проанализировано. Порог интенсивности для детекции пикселей и классификации был подобран для каждого типа иммунофлуоресцентной реакции отдельно и применен ко всем фотографиям в выборке одновременно для всех групп конкретного эксперимента.

Статистический анализ. Результаты представлены в виде диаграммы размаха (“ящик с усами”). Горизонтальная линия — медиана, размах усов соответствует доверительному интервалу. Данные, полученные после иммуногистохимии, анализировали регрессионным анализом с использованием смешанных линейных моделей в пакете nlme, R статистики, так как значения параметров, полученные от одного животного считали взаимосвязанными [20], апостериорное сравнение средних проводили с использованием критерия Тьюки. При обработке данных по экспрессии мРНК использовали двухфакторный дисперсионный анализ (факторы — “ЛПС” и “сторона стриатума” (левая или правая)) в программе STATISTICA (ver. 6.0; StatSoft, Inc., 2001), с последующим апостериорным анализом межгрупповых различий по критерию Фишера LSD. Данные по неврологическому дефициту обрабатывали путем прямых парных сравнений с использованием

ем t -критерия Стьюдента. Во всех статистических анализах различия считались достоверными, начиная с $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через сутки после введения ЛПС у животных был обнаружен выраженный неврологический дефицит. В тесте Гарсия эти животные по сравнению с контролем демонстрировали снижение двигательной активности, нарушения координации и проприорецепции (t -критерий = 4.54; $p < 0.001$ по суммарному количеству баллов; рис. 1а). В Placing test (рис. 1б) нарушения проявлялись парезом передних лап с обеих сторон: правой (t -критерий = 4.50; $p < 0.001$) и левой (t -критерий = 4.13; $p < 0.001$).

Неврологическому дефициту после ЛПС сопутствовало достоверное увеличение в области правого стриатума (области введения эндотоксина) числа клеток, экспрессирующих исполнительную протеазу апоптоза активную каспазу-3 (влияние ЛПС: $F(3, 98) = 65.97$, $p < 0.0001$, рис. 2а). Этого эффекта не было в области левого стриатума, что подтверждается апостериорным сравнением средних, группа с введением ЛПС в область правого стриатума отличалась от трех других с вероятностью $p < 0.0001$. В области правого стриатума (влияние ЛПС: $F(3, 98) = 46.7$, $p < 0.0001$), но не левого (апостериорное сравнение, группа с введением ЛПС в область правого стриатума отличалась от трех других с вероятностью $p < 0.0001$), после

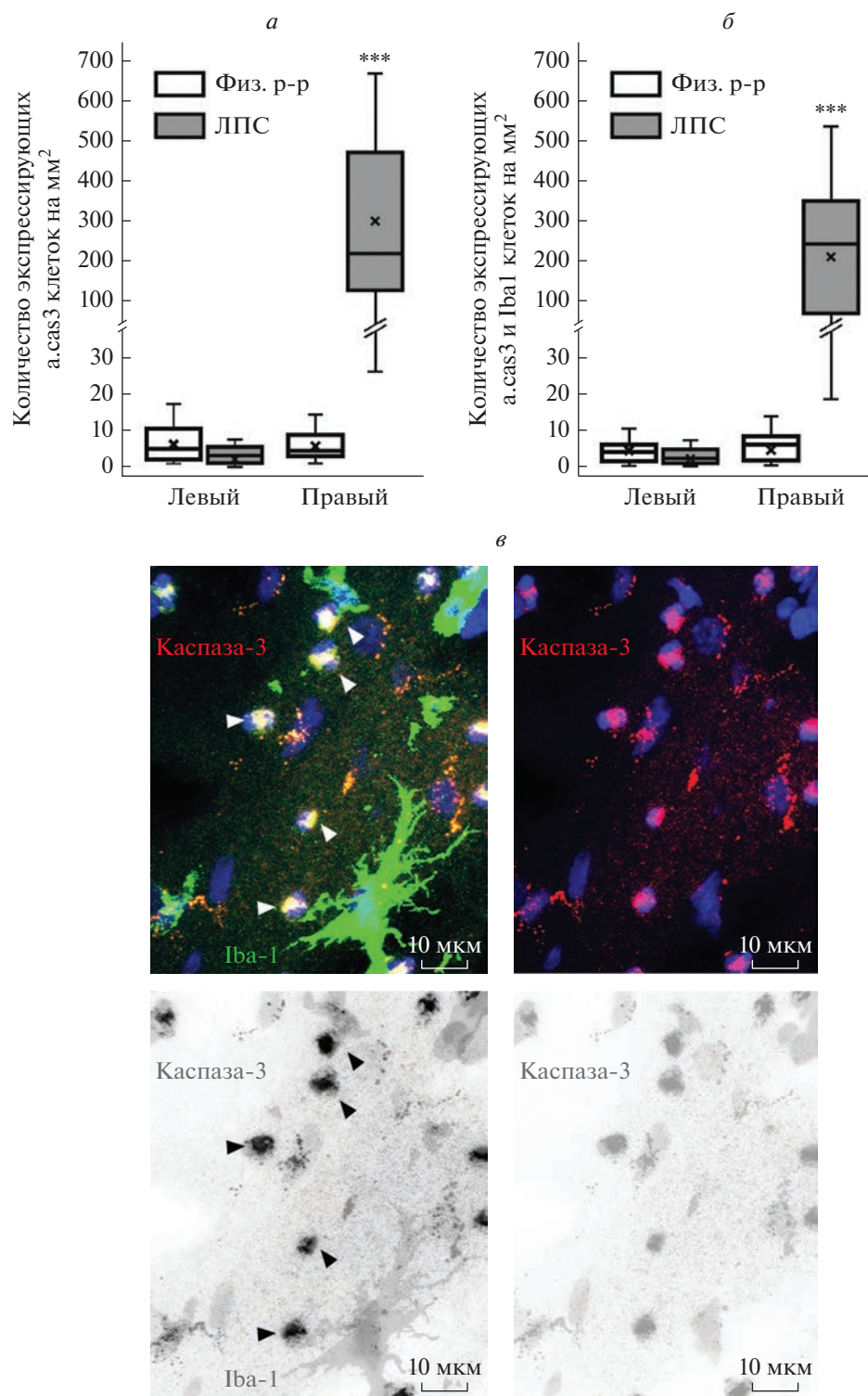


Рис. 2. Количество иммунопозитивных клеток в областях правого и левого стриатума через сутки после введения ЛПС. Данные представлены в виде диаграммы размаха (“ящик с усами”). Горизонтальная линия — медиана, размах усов соответствует доверительному интервалу. Белый столбик — группа с введением физиологического раствора (Физ. р-р), серый столбик — группа с введением ЛПС (ЛПС). *а* — плотность клеток, экспрессирующих активную каспазу-3, *** $p < 0.001$ по сравнению со всеми группами; *б* — плотность микроглиальных клеток, коэкспрессирующих активную каспазу-3, *** $p < 0.001$ по сравнению со всеми группами; *в* — репрезентативная микрофотография активации микроглии в правом стриатуме в очаге введения ЛПС, стрелками отмечена экспрессия активной каспазы-3 в микроглиальных клетках.

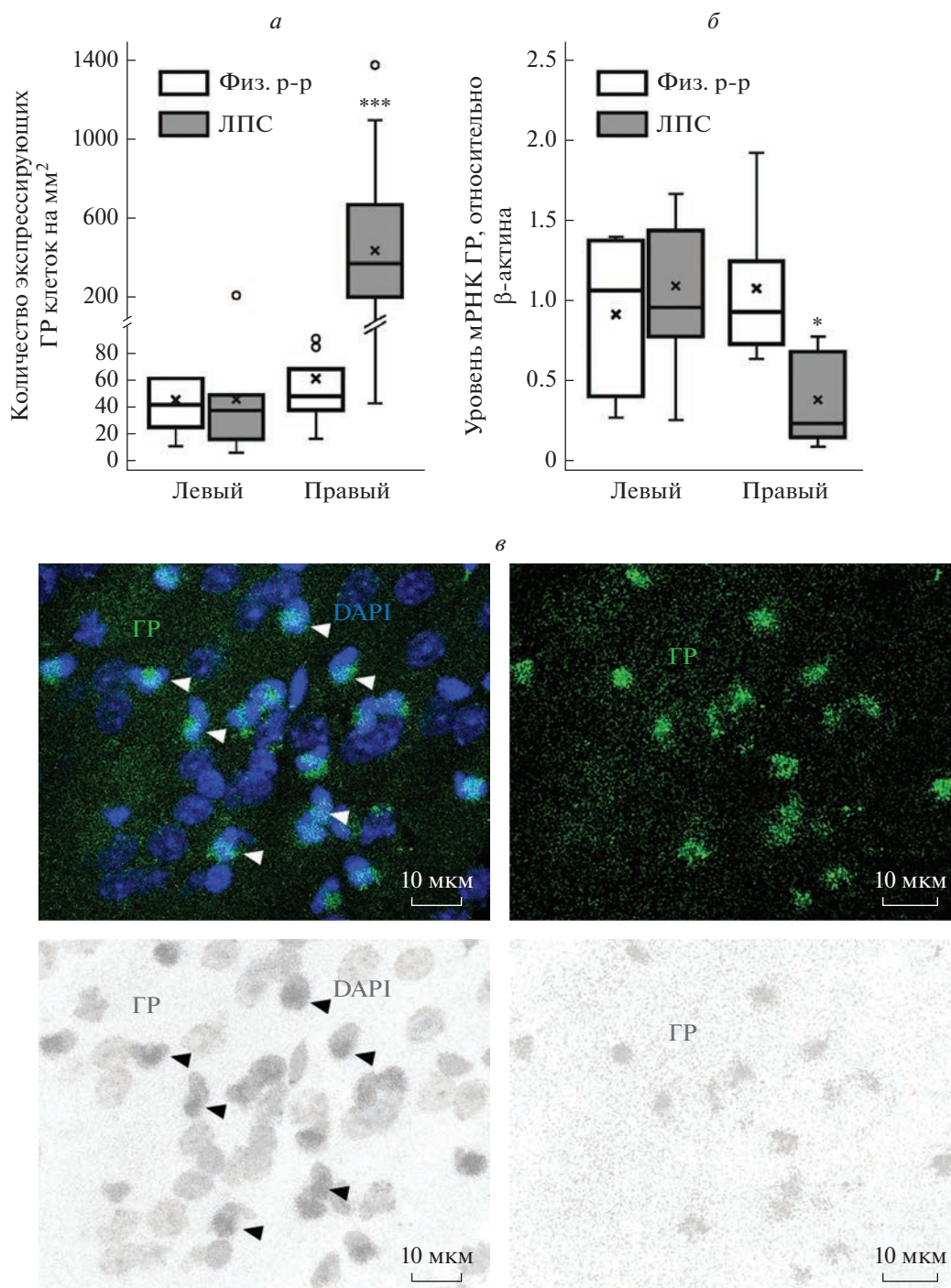


Рис. 3. Уровень мРНК и экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в стриатуме через сутки после введения ЛПС в область правого стриатума. Данные представлены в виде диаграммы размаха (“ящик с усами”). Горизонтальная линия – медиана, размах усов соответствует доверительному интервалу. Белый столбик – группа с введением физиологического раствора (физ. р-р), серый столбик – группа с введением ЛПС (ЛПС). По оси Y представлено изменение уровня мРНК целевого гена в разях относительно уровня мРНК гена домашнего хозяйства бета-актина. *а* – плотность клеток в стриатуме, экспрессирующих глюкокортикоидные рецепторы, *** $p < 0.001$ по сравнению со всеми группами; *б* – уровень мРНК глюкокортикоидных рецепторов в стриатуме, * $p < 0.05$ по сравнению со всеми группами; *в* – репрезентативная микрофотография глюкокортикоидных рецепторов и их транслокации в ядра в области правого стриатума (отмечены стрелками).

ЛПС было также достоверно увеличено число клеток, коэкспрессирующих маркер активированной микроглии Iba-1 и активную каспазу-3 (рис. 2б, в).

Анализ экспрессии ГР показал, что введение ЛПС приводило через сутки к достоверному увеличению числа ГР-иммунопозитивных клеток в области правого стриатума, но не левого (влияние ЛПС: $F(3, 68) = 24.72, p < 0.0001$; апостериорное сравнение, группа с введением ЛПС в область правого стриатума отличалась от трех других с вероятностью $p < 0.0001$) (рис. 3а). Повышение экспрессии белка ГР после введения ЛПС в область правого стриатума контрастировало со снижением уровня его мРНК в этом отделе (влияние ЛПС: $F(1, 22) = 2.33, p = 0.14$; взаимодействие факторов: $F(1, 22) = 5.98, p < 0.03$; апостериорное сравнение, группа с введением ЛПС в область правого стриатума отличалась от трех других с вероятностью $p < 0.05$) (рис. 3б).

Результаты иммуногистохимического анализа свидетельствуют не только об увеличении экспрессии ГР в области правого стриатума после ЛПС, но и об активации в области введения функциональной активности рецепторов. На этот эффект указывает усиление транслокации рецепторов из цитоплазмы в ядро, проиллюстрированное на репрезентативных микрофотографиях (рис. 3в).

ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный ЛПС широко используется для экспериментального моделирования ассоциированных с нейровоспалением психопатологий [21]. Эндотоксин чаще вводят периферически. Центральное введение включает как желудочки мозга, так и отдельные структуры, например, черную субстанцию для моделирования болезни Паркинсона [22], или стриатум для моделирования постишемических последствий [11].

Бальная оценка неврологической функции показала значительный неврологический дефицит у животных после ЛПС. Следует отметить, что использованные тесты, прежде всего, тест Гарсия [13] был разработан для подтверждения наличия ишемического повреждения в модельных экспериментах на грызунах, однако он также используется с аналогичными целями и после травматического повреждения головного мозга на этих животных. Центральное введение препаратов, безусловно, травматическая процедура, а отличие результатов двух групп, одной из которых вводили физиологический раствор, а другой ЛПС, указывает на зависимость поведенческих эффектов от провоспалительного воздействия.

Развитию неврологического дефицита после ЛПС сопутствовало увеличение экспрессии активной каспазы-3 в области введения, что согласуется с представлением о связи неврологического наруше-

ния с активацией апоптоза [23] или пироптоза [24, 25]. Вместе с тем, остается неясным функциональное значение повышенной экспрессии каспазы-3 конкретно в микроглиальных клетках. Одно из объяснений — участие в механизмах активации микроглии. Подобный эффект был обнаружен через 24 ч после введения ЛПС в черную субстанцию крысы, а нокдаун или химическое угнетение каспазы-3 ослабляли активацию микроглии [26, 27]. Активная каспаза-3 в микроглиальных клетках может также вовлекаться в провоспалительную функцию клеток, провоцируя процесс протеолиза и выброс про-воспалительных цитокинов в межклеточное пространство [28]. Поскольку сама активация каспазы-3 не всегда вызывает гибель микроглиальных клеток [29], важно принимать во внимание и другие регуляторные факторы развития нейровоспаления. Непосредственное участие в модуляции активации микроглии при нейровоспалительных патологиях головного мозга принимают глюкокортикоиды. Повышение их уровня коррелирует с увеличением выброса микроглией провоспалительных цитокинов [8].

В данном эксперименте воздействие провоспалительным стимулом привело через сутки к увеличению экспрессии ГР с одновременным снижением мРНК этих рецепторов через 24 ч после введения ЛПС, что может быть связано с авторегуляцией экспрессии ГР. Эти эффекты могли быть обусловлены увеличением уровня кортикостерона в крови [30]. Снижение уровня мРНК ГР в гиппокампе при вызванном острым стрессом повышении глюкокортикоидов наблюдалось в ряде работ [31–33]. Функциональное значение как активации, так и ингибирования функции ГР при воспалении пока не ясно. Исходя из имеющихся в настоящее время сведений, ГР, по-видимому, могут вовлекаться как в механизмы потенциации провоспалительной активации, так и ее ограничения. Факторы, обуславливающие про- или анти-воспалительное действие ГР в головном мозге, требуют дальнейшего исследования, учитывающие стадию нейровоспалительного процесса, и, особенно, изоформы ГР. Например, на культурах разных клеток человека показано зависимое от типа клетки повышающее влияние ЛПС преимущественно на альфа изоформу ГР [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прямое внутримозговое введение ЛПС (в область правого стриатума крыс) вызывало у животных через сутки выраженный неврологический дефицит, которому в области введения ЛПС сопутствовало увеличение числа клеток, экспрессирующих исполнительную протеазу апоптоза активную каспазу-3, а также числа микроглиальных клеток, коэкспрессирующих эту каспазу. Через сутки после введения ЛПС в правый стриатум

была также увеличена плотность ГР. Результаты свидетельствуют об острых изменениях активности микроглиальных клеток, а также экспрессии и функциональной активности ГР в ответ на бактериальный эндотоксин. Дальнейшее выяснение функциональной роли активной каспазы-3 и ГР в микроглиальных клетках в условиях провоспалительной активации может помочь в определении мишеней для ослабления симптомов неврологического расстройства.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-64-47013). Содержание животных осуществлялось за счет средств 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. Si Z.Z., Zou C.J., Mei X., Li X.F., Luo H., Shen Y., Hu J., Li X.X., Wu L., Liu Y. // *Neural Regen. Res.* 2023. V. 18. № 4. P. 708–715.
2. Öberg M., Fabrik I., Fabrikova D., Zehetner N., Härtlova A. // *Scand. J. Immunol.* 2021. V. 93. № 5.
3. Schimmel S.J., Acosta S., Lozano D. // *Brain Circ.* 2017. V. 3. № 3. P. 135–142.
4. Thiel A., Cechetto D.F., Heiss W.D., Hachinski V., Whitehead S.N. // *Stroke.* 2014. V. 45. № 9. P. 2825–2829.
5. Shishkina G.T., Kalinina T.S., Gulyaeva N.V., Lanshakov D.A., Dygalo N.N. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2021. V. 86. № 6. P. 657–666.
6. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. // *Physiol Rev.* 2011. V. 91. № 2. P. 461–553.
7. Bolshakov A.P., Tret'yakova L.V., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V. // *Neuroinflammation. Biochemistry (Mosc.)*. 2021. V. 86. № 2. P. 156–167.
8. Sorrells S.F., Munhoz C.D., Manley N.C., Yen S., Sapolsky R.M. // *Neuroendocrinology.* 2014. V. 100. № 2–3. P. 129–140.
9. Carrillo-de Sauvage M.Á., Maatouk L., Arnoux I., Pasco M., Sanz Diez A., Delahaye M., Herrero M.T., Newman T.A.,

- Calvo C.F., Audinat E., Tronche F., Vyas S. // *Cell Death Differ.* 2013. V. 20. № 11. P. 1546–1557.
10. Hu S., Shen P., Chen B., Tian S.W., You Y. // *Neuroscience Letters.* 2022. V. 788. P. 136850.
11. Shishkina G.T., Gulyaeva N.V., Lanshakov D.A., Kalinina T.S., Onufriev M.V., Moiseeva Y.V., Sukhareva E.V., Babenko V.N., Dygalo N.N. // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 12. P. 1840.
12. Paxinos G., Watson C. // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, 1998.
13. Garcia J.H., Wagner S., Liu K.F., Hu X. // *Stroke.* 1995. V. 26. № 4. P. 627–635.
14. Hua Y., Schallert T., Keep R.F., Wu J., Hoff J.T., Xi G. // *Stroke.* 2002. V. 33. № 10. P. 2478–2484.
15. Дайнеко А.С., Шмонин А.А., Шумеева А.В., Коваленко Е.А., Мельникова Е.В., Власов Т.Д. // *Экспериментальные исследования*, 2014. V. 13. № 1. С. 68–78.
16. Shi X., Bai H., Wang J., Wang J., Huang L., He M., Zheng X., Duan Z., Chen D., Zhang J., Chen X., Wang J. // *Frontiers in Neurology.* 2021. V. 12.
17. Shmonin A., Melnikova E., Galagudza M., Vlasov T. // *International Journal of Stroke.* 2012. V. 9. № 6. P. 793–801.
18. Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. // *Neurobiol. Dis.* 2016. V. 91. P. 1–9.
19. Bankhead P., Loughrey M.B., Fernández J.A., Dombrowski Y., McArt D.G., Dunne P.D., McQuaid S., Gray R.T., Murray L.J., Coleman H.G., James J.A., Salto-Tellez M., Hamilton P.W. // *Scientific Reports.* 2017. V. 7. № 1.
20. Четвериков А.А. // *Российский журнал когнитивной науки.* 2015. V. 2. № 1. С. 41–51.
21. Batista C.R.A., Gomes G.F., Candelario-Jalil E., Fiebich B.L., de Oliveira A.C.P. // *International Journal of Molecular Sciences.* 2019. V. 20. № 9. P. 2293.
22. García-Revilla J., Herrera A.J., de Pablos R.M., Venero J.L. // *J. Parkinson's Dis.* 2022. V. 12. P. S165–S182.
23. Kim J.A., Kim Y.Y., Lee S.H., Jung C., Kim M.H., Kim D.Y. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 13. P. 6975.
24. Yu P., Zhang X., Liu N., Tang L., Peng C., Chen X. // *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2021. V. 6. № 1.
25. Bahatyrevich-Kharitonik B., Medina-Guzman R., Flores-Cortes A., García-Cruzado M., Kavanagh E., Burguillos M.A. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2022. V. 9.
26. Burguillos M.A., Deierborg T., Kavanagh E., Persson A., Hajji N., Garcia-Quintanilla A., Cano J., Brundin P., Englund E., Venero J.L., Joseph B. // *Nature.* 2011. V. 472. № 7343. P. 319–324.
27. Kavanagh E., Rodhe J., Burguillos M.A., Venero J.L., Joseph B. // *Cell Death & Disease.* 2014. V. 5. № 12. P. e1565.
28. Jiang M., Qi L., Li L., Li Y. // *Cell Death Discovery.* 2020. V. 6. № 1.
29. Sarić N., Hashimoto-Torii K., Jevtović-Todorović V., Ishibashi N. // *Trends in Neurosciences.* 2022. V. 45. № 6. P. 446–458.

30. Brkic Z., Petrovic Z., Franic D., Mitic M., Adzic M. // *Psychopharmacology (Berl.)*. 2016. V. 18. P. 3315–3330.
31. Romeo R.D., Ali F.S., Karatsoreos I.N., Bellani R., Chhava N., Vernov M., McEwen B.S. // *Neuroendocrinology*. 2007. V. 87. № 3. P. 160–167.
32. Noguchi T., Makino S., Matsumoto R., Nakayama S., Nishiyama M., Terada Y., Hashimoto K. // *Endocrinology*. 2010. V. 151. № 9. P. 4344–4355.
33. Green M.R., Nottrodt R.E., Simone J.J., McCormick C.M. // *Psychoneuroendocrinology*. 2016. V. 73. P. 32–41.
34. Molina M.L., Guerrero J., Cidlowski J.A., Gatica H., Goecke A. // *J. Inflamm.* 2017. V. 14. P. 22.

Rapid Changes in the Expression of Active Caspase-3 and Glucocorticoid Receptors in Striatum Cells Induced by Neuroinflammation

V. V. Bulygina^a, G. T. Shishkina^a, D. A. Lanshakov^a, T. S. Kalinina^a, N. P. Komysheva^a,
U. S. Drozd^a, E. V. Suhareva^a, and N. N. Dygalo^a

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

Activation of microglia, resident immune cells of the central nervous system, plays a key role in the pathogenesis of neurological disorders induced by infections, as well as traumatic and ischemic events. Understanding the responses of brain cells, primarily microglial cells, to damaging effects can help overcome their pathological consequences. In this work, we analyzed the cellular effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS), which is widely used as a pro-inflammatory stimulus. The injection of LPS into the area of right striatum of rats caused a pronounced neurological deficit in a day, which was accompanied by an increase in the number of microglial cells, an increase in the density of glucocorticoid receptors (GR) and their translocation into the nuclei of cells co-expressing the executive protease of apoptosis, active caspase-3 and GR, in the area of LPS injection. The results indicate acute changes in the activity of microglial cells, as well as in the expression and functional activity of GR in response to bacterial endotoxin. Further elucidation of the functional role of active caspase-3 and GR in microglial cells under conditions of pro-inflammatory activation may help identify targets for alleviating the symptoms of a neurological disorder.

Keywords: striatum, lipopolysaccharide, microglia, cleaved caspase-3, glucocorticoid receptors, neurological deficit

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.218+611.815

АКТИВНОСТЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ДОРСАЛЬНОГО ЯДРА ШВА НЕОБХОДИМА ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ АНТИДЕПРЕССАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ КЕТАМИНА

© 2023 г. У. С. Дрозд^{1, 2, *}, Д. А. Ланшаков^{1, 2}, Н. Н. Дыгало^{1, 2}

¹ ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 08.02.2023 г.

После доработки 21.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

Кетамин – быстродействующий антидепрессант, вовлекает в свой терапевтический эффект серотонинергическую нейротрансмиссию. В работе исследована остававшаяся неясной зависимость этого эффекта препарата от активности серотонинергических (5-НТ) нейронов. Для этого определяли влияние кетамина на проявление депрессивно-подобного поведения крыс в тесте подвешивания за хвост на фоне оптогенетического снижения активности 5-НТ нейронов дорсального ядра шва мозга (DRN). В отличие от контрольных животных, у которых субанестетическая доза кетамина ослабляла проявление депрессивно-подобного поведения, на фоне блокады активности 5-НТ нейронов препарат не только утрачивал свое антидепрессантное действие, но и индуцировал про-депрессантное поведение. При этом, оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов препятствовало вызванному кетаминотом повышению экспрессии c-Fos как в светочувствительных нейронах, так и в других нейронах DRN. Полученные результаты свидетельствуют, что активность 5-НТ нейронов является важным звеном быстрого терапевтического действия субанестетических доз кетамина.

Ключевые слова: кетамин, депрессивноподобное поведение, тест подвешивание за хвост, серотонин, дорсальное ядро шва, оптогенетика, eArchT3.0, лентивирусный вектор, белок c-Fos

DOI: 10.31857/S1027813323030081, EDN: YUSMKU

ВВЕДЕНИЕ

Большое депрессивное расстройство – многофакторное заболевание, характеризующееся дисфункциями нейротрансмиттерных систем мозга [1, 2]. Кетамин – один из быстродействующих антидепрессантов, эффективен в клинике даже у пациентов, страдающих депрессией, устойчивой к лечению другими препаратами [3, 4]. Антидепрессантное действие кетамина в первую очередь проявляется через антагонизм к рецепторам глутамата типа NMDAR [5, 6]. Для эффектов кетамина, связанных с NMDAR, предполагается два возможных пути действия: преимущественного ингибирования NMDAR на ГАМК-ергических интернейронах и, тем самым, растормаживания глутаматергических нейронов, или ингибирования NMDAR пирамидных нейронов, что приводит к уменьшению подавления эукариотического фактора элонгации 2 и повышению синаптической пластичности и активности этих нейронов [7–9].

В дополнение к глутаматергическим эффектам, кетамин модулирует и моноаминергическую нейротрансмиссию. Он увеличивает активность серотонинергических (5-НТ) нейронов дорсального ядра шва (DRN) [9, 10], а в префронтальной коре (PFC) повышает внеклеточный уровень 5-НТ и вызываемое им возбуждение [11, 12]. При этом стимулируются 5-НТ_{1A} рецепторы PFC, активирующие сигнальный путь PI3K/Akt/mTORC1 [10]. Кетамин также модулирует связывание 5-НТ с его рецепторами 1B типа [13], активация которых вовлекается в действие антидепрессанта [14].

Активность DRN регулируется несколькими глутаматергическими афферентными проекциями, в том числе поступающими из PFC [10], которые контролируют выбор активного/пассивного поведенческого состояния и социальный выбор [11]. Вызванное кетаминотом повышение активности 5-НТ системы может быть опосредовано глутаматергическими проекциями медиальной префронтальной коры (mPFC) в DRN [12]. Это подтверждается тем, что локальная инъекция кетамина в DRN не оказывает антидепрессантного эффекта, в отличие от локальной инъекции этого препарата в

* Адресат для корреспонденции: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10; e-mail: drozd@bionet.nsc.ru.

mPFC [15]. Оптогенетическая стимуляция возбуждающих афферентов от mPFC к DRN активирует 5-НТ нейроны DRN [16]. Однако такая стимуляция активирует и ГАМК-ергические нейроны DRN, которые, напротив, ингибируют 5-НТ нейроны [17]. Кетамин активирует также и холинергические нейроны педункулопонтинного ядра покрышки, дающие проекции на нейроны DRN, а повышенный уровень ацетилхолина стимулирует пресинаптические никотиновые рецепторы $\alpha 4\beta 2$, локализованные на глутаматергических нейронах DRN [18], что приводит к увеличению локального высвобождения глутамата. Активация глутаматом AMPA-рецепторов на 5-НТ нейронах DRN индуцирует высвобождение 5-НТ в mPFC [15]. Не остается сомнений что, кетамин влияет на активность 5-НТ нейронов DRN, и его антидепрессантные эффекты могут быть связаны с его действием на 5-НТ систему [12, 14–16]. Хотя блокада синтеза 5-НТ фармакологическими методами ослабляет или устраняет устойчивые поведенческие эффекты кетамина [19, 20], снижение уровня 5-НТ не влияет на острые эффекты кетамина, и лишь затрудняет развитие длительного антидепрессантного действия [21]. Поэтому остается не ясным, является ли активация 5-НТ нейронов DRN важным звеном в цепочке быстрого антидепрессантного действия кетамина.

В целом, несмотря на значительный объем информации о взаимодействии глутамата и 5-НТ в механизме действия кетамина, роль активации 5-НТ нейронов DRN в проявлении антидепрессантного действия этого препарата остается неясной. Для устранения этого пробела в данной работе изучали влияние оптогенетического [22], быстрого подавления активности 5-НТ нейронов DRN, в проявлении антидепрессивного действия кетамина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов были созданы лентивирусные частицы на основе плазмид, полученных от проф. Нишитани [23], при помощи трансфекции культуры клеток HEK293. Плазида TRN2-eArchT3.0-eYFP-WPRE содержит последовательность гена протонного насоса археародопсина (eArchT3.0), конъюгированного с желтым флуоресцентным белком (eYFP), экспрессия которого регулируется промотором TRN2. В качестве контроля использовалась плазида TRN2-Venus-WPRE (Venus), кодирующая зеленый флуоресцентный белок Venus. Клетки были трансфицированы смесью плазмид для сборки вирусного капсида (pPAX2 и pMD2.G) и TRN2-eArchT3.0-eYFP-WPRE либо TRN2-Venus-WPRE при помощи полиэтиленimina [24]. Вирусные частицы были выделены из культуры клеток с использованием PEG 6000, осаждены на колонках с четвертичным аммонием

(DIAPAC-TA, ЗАО БиоХимМак СТ, Россия) и сконцентрированы до титра 10^{12} частиц/мл на центрифужных концентраторах Amicon Ultra-4 (Мерк, США) [25].

В экспериментах использовали взрослых, 2,5–3-месячных самцов крыс линии Wistar, весом 220–250 г. Животные содержались в виварии ИЦиГ СО РАН по 4 в клетках (40 см × 25 см × 15 см) в условиях свободного доступа к воде и корму, при 12-ч цикле свет/темнота и температуре 20–22°C. Все процедуры проводились в соответствии с Международными европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС), российскими правилами работы над лабораторными животными (N 267 19.06.2003) и были разрешены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН. Все манипуляции с животными проводились между 9 и 13 ч. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

В DRN вирусные частицы вводили стереотаксически по координатам AP = –7.7 мм, ML = 0 мм, DV = 7 мм [26]. Животных наркотизировали авертином, фиксировали в стереотаксической раме, и через небольшое отверстие в черепе, микро-шприцом нейрос (Гамильтон, США) в течение 7 мин вводили 1 мкл вирусных частиц. Разрез кожи зашивали и проводили обработку антибиотиками.

Через неделю в область DRN стереотаксически вживляли и закрепляли на черепе оптоволоконные канюли. Для этого использовали расширенное отверстие в черепе, сделанное для введения вируса, с последующей постоперационной обработкой.

Через неделю после вживления оптоволоконных канюль четверем животным из каждой группы был введен кетамин в субанестетической дозе (15 мг/кг веса тела), а четверем другим – физиологический раствор в эквивалентном объеме (0.5 мл/100 г веса тела) внутрибрюшинно. Через час после инъекции все животные подвергались оптической стимуляции в процессе теста подвешивание за хвост. Для этого оптоволоконный кабель соединяли с канюлей, после чего животных быстро подвешивали клейкой лентой за область основания хвоста на высоте 60 см от пола на 5 мин. В 1, 3 и 5 мин теста DRN облучали зеленым светом (560 нм, 1.2 мВ/мм², 20 Гц). У одной крысы группы eArchT3.0-eYFP x Кетамин оптокабель отсоединился от канюли, и животное было из эксперимента. Поведение в тесте записывали на видеокамеру, и время неподвижности в тесте оценивалось экспертами, неосведомленными о принадлежности животного к группе воздействия.

Через 1 ч после теста наркотизированных авертином животных транкардиально перфузировали 1× PBS и 4% PFA. Извлеченный мозг постфиксировали 12 ч в 4% параформальдегиде, затем сутки в 30% сахарозе, после чего замораживали в геле Richard-Allan Scientific Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при температуре –70°C.

Для иммуногистохимического анализа приготавливались срезы толщиной 20 мкм на криотоме,

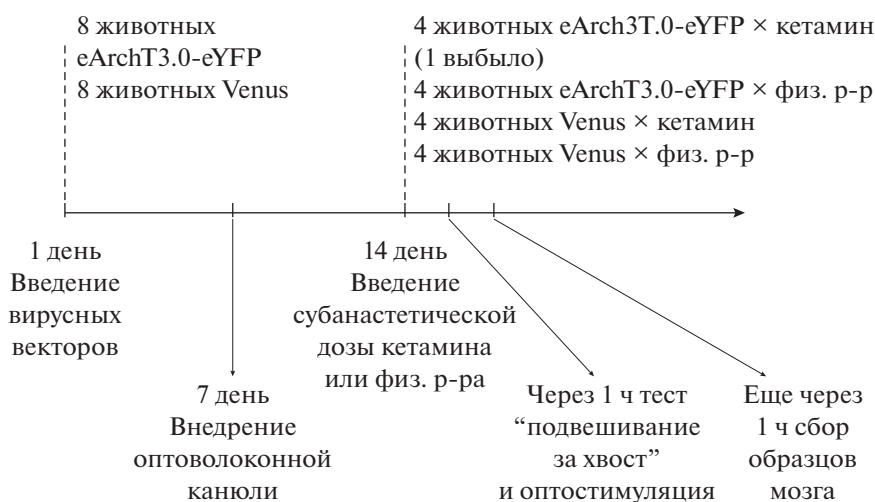


Рис. 1. Схема эксперимента.

которые перед окрашиванием высушивали при температуре 37°C в течение 1 ч и промывали 10 мин. в PBS с 0.2% Triton X-100 (PBST). Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в PBST, содержащем 1.5% бычий сывороточный альбумин (BSA) в течение часа при комнатной температуре. С первичными антителами (табл. 1) срезы инкубировали в течение ночи при температуре +4°C. Антитела разводили в PBST, содержащем 1.5% BSA в разведении 1 : 200. После инкубации с первичными антителами срезы промывали дважды по 15 мин в PBST и инкубировали с вторичными антителами (табл. 1) в разведении 1 : 500 в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем дважды промывали в PBST, 1 раз в PBS по 15 мин и заключали в мовеол, содержащий ядерный краситель DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) [27].

Препараты фотографировали с помощью конфокального микроскопа LSM780NLO ("Carl Zeiss", Германия) при 20× увеличении. Анализ фотографий проводили с помощью программы QuPath [28]. Подсчитывалось количество c-Fos, eArchT3.0-eYFP/Venus и TRH2 экспрессирующих нейронов на 1 мм², а также количество коэкспрессирующих eArchT3.0-eYFP/Venus + TRH2 нейронов для оценки специфичности и эффективности экспрессии вирусных векторов, а также eArchT3.0-eYFP/Venus + c-Fos клеток для оценки влияния облучения светом на активность нейронов. В программе QuPath для этого использовалась детекция клеток по ядрам, окрашенным DAPI с последующей классификацией, осуществленной на основе подсчета зеленых и красных пикселей. Порог интенсивности для детекции пикселей и классификации был подобран для каждого типа окрашивания отдельно и применен ко всем фотографиям в выборке одинаково.

По количественным данным рассчитывалось среднее значение со стандартным отклонением от среднего. Для оценки экспрессии c-Fos в экспрес-

сирующих вектор нейронах рассчитывался процент коэкспрессирующих eArchT3.0-eYFP/Venus + c-Fos от общего числа экспрессирующих вектор клеток по формуле (количество коэкспрессирующих клеток/количество экспрессирующих c-Fos клеток) × 100%.

Для проверки нормальности данных был использован тест Колмогорова—Смирнова. Показатели поведенческого теста обрабатывали двухфакторным дисперсионным анализом для повторных измерений (фактор 1 — вектор, фактор 2 — кетамин), а результаты иммуногистохимического анализа оптогенетической модуляции активности нейронов чувствительной и нечувствительной к свету групп животных двухфакторным дисперсионным анализом (фактор 1 — вектор, фактор 2 — кетамин), с последующим апостериорным сравнением по Фишеру. Достоверным результат считали при $p < 0.05$. Статистические расчеты проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ депрессивноподобного поведения в тесте подвешивание за хвост выявил достоверное влияние качества вектора (фоточувствительный или нет) на время неподвижности (Вектор: $F(1, 11) = 12.681, p < 0.004$) и наличие взаимодействия факторов Вектор × Кетамин: ($F(1, 11) = 18.508, p < 0.001$). У животных с контрольным вектором наблюдалось вызванное кетамином снижение времени неподвижности, что особенно проявлялось на 2 и 3 мин теста. Оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов DRN обращало этот антидепрессантный эффект в про-депрессантный — время неподвижности в тесте подвешивание за хвост увеличивалось. Наиболее показательны первые минуты теста, в течение 1 и 3 из которых DRN освещали зеленым светом, и у животных группы "eArchT3.0 × Кетамин" проявлялся про-депрес-

Таблица 1. Антитела, использованные для иммуногистологического выявления белков

Выявляемый белок	Первичные антитела	Вторичные антитела
c-Fos	9F6, Rabbit, "Cell Signaling"	711-606-152 Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L), "Jackson ImmunoResearch Laboratories"
eArchT3.0-eYFP/Venus	AB1218, "Rabbit, Abcam"	711-545-152 Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L), "Jackson ImmunoResearch Laboratories"
TPH2	AB1541, Sheep, "Millipore"	20095, Donkey Anti-Sheep IgG (H + L), CF568, "Biotium"

сантный эффект препарата. В течение 2-ой мин, когда освещение не проводилось, эта группа не отличалась от контрольной. К 4-ой и 5-ой мин теста антидепрессантный эффект кетамина у группы "Venus × Кетамин" нивелировался, а у животных группы "eArchT3.0 × Кетамин" про-депрессантный эффект оптогенетической стимуляции сохранялся (рис. 2).

Длительность неподвижности в каждую мин теста увеличивалась по мере его продолжительности (Мин теста: $F(4, 44) = 15.6739$, $p = 0.000$). Эффект кетамина также зависел от продолжительности теста (Кетамин × Мин $F(4, 44) = 3.683$, $p = 0.011$).

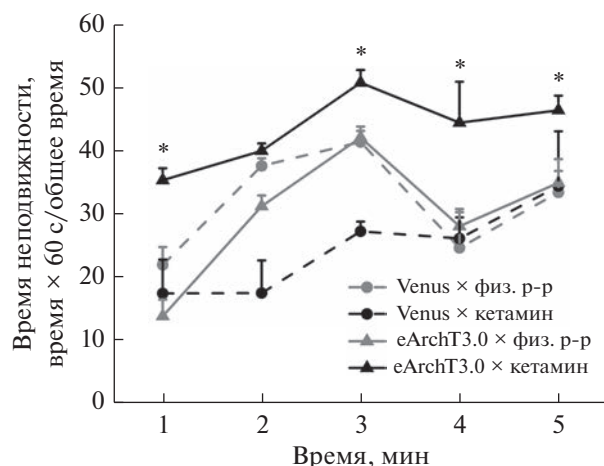


Рис. 2. Изменение времени неподвижности в течение каждой из 5 мин теста подвешивания за хвост при оптогенетическом подавлении активности 5-НТ нейронов DRN на фоне предварительного введения кетамина. Кетамин (15 мг/кг), введенный за час до теста, снижал время неподвижности у животных с контрольным вектором, но увеличивал его у животных с вектором, экспрессирующим eArchT3.0. В течение 1, 3, 4 и 5 мин теста фоточувствительные животные группы "eArchT3.0 × Кетамин" достоверно превосходили контрольных крыс "Venus × Кетамин" по продолжительности неподвижности ($n = 4$ (3 в группе "eArchT3.0 × Кетамин"), $n =$ количество животных в группе. * p от <0.05 до <0.001).

Через 2 недели после введения векторов $90.72 \pm 1.13\%$ нейронов, экспрессирующих Venus, а также $94.05 \pm 1.03\%$ нейронов, экспрессирующих eArchT3.0-eYFP, были также иммунопозитивны по TPH2. Следовательно, векторы специфически экспрессировались в 5-НТ нейронах (рис. 3). Кроме того, $42.46 \pm 2.16\%$ TPH2 позитивных нейронов экспрессировали Venus, и $41.64 \pm 2.12\%$ экспрессировали eArchT3.0-eYFP.

У животных с контрольным вектором кетамин повышал процент нейронов, экспрессирующих c-Fos среди экспрессирующих вектор Venus клеток. Однако у животных с вектором, кодирующим фоточувствительный белок, экспрессия c-Fos в клетках, иммунопозитивных по eArchT3.0-eYFP, после введения кетамина и фотостимуляции не изменялась (рис. 4а).

Количество коэкспрессирующих c-Fos + TPH2 нейронов было повышено у животных, которые получали кетамин и не были чувствительны к свету, по сравнению со всеми остальными группами. Однако у животных, активность 5-НТ нейронов DRN которых была оптогенетически подавлена, кетамин не вызывал увеличения количества коэкспрессирующих c-Fos + TPH2 нейронов (рис. 4б).

Вместе с тем, кетамин увеличивал в DRN контрольных животных количество нейронов, которые экспрессировали только c-Fos, но не вектор и/или TPH2. Однако у животных, активность 5-НТ нейронов которых была оптогенетически подавлена, такого увеличения не происходило (рис. 4в). В то же время, у животных, которым вводили физиологический раствор, оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов не изменяло экспрессию c-Fos в DRN.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

За последние 20 лет кетамин привлек большое внимание из-за его быстрого антидепрессивного действия после однократной субанестетической дозы у пациентов с резистентной к лечению депрессией [2, 3]. На животных моделях было показано, что этот препарат уменьшает проявление депрессивноподобного поведения и увеличивает активность AMPAR, уровень фосфорилирован-

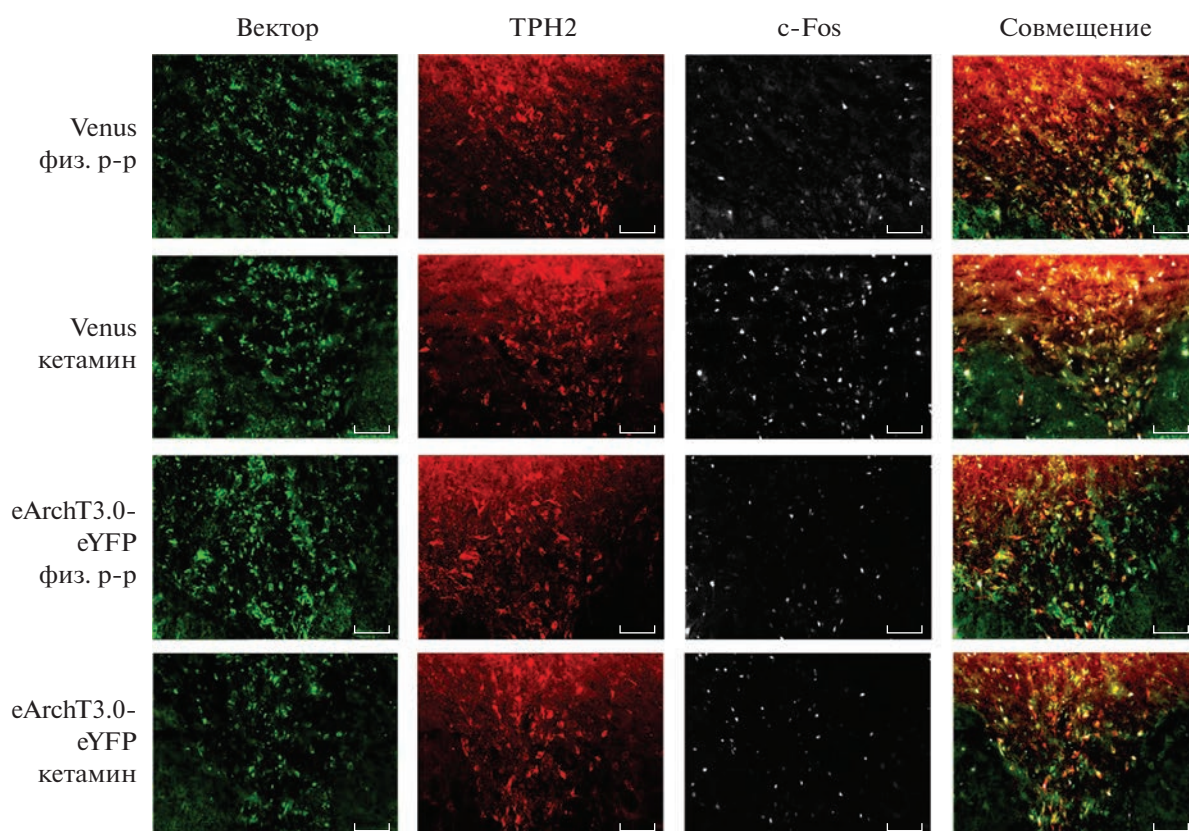


Рис. 3. Экспрессия c-Fos и векторов в нейронах, экспрессирующих триптофангидроксилазу-2 (TPH2) после оптогенетического ингибирования 5-НТ нейронов DRN в тесте подвешивание за хвост после предварительного введения субанестетической дозы кетамина. Векторы специфично экспрессировались в 5-НТ нейронах. Кетамин увеличивал экспрессию c-Fos в нейронах DRN, оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов, предупреждало это повышение. Шкала 100 мкм.

ного mTOR и экспрессию BDNF [7]. Кроме того, многие исследования подчеркивали участие 5-НТ нейротрансмиссии в механизме действия кетамина [12, 14–16].

Действительно, в нашем эксперименте субанестетическая доза кетамина ожидаемо снижала депрессивноподобное поведение у животных с функционально активными 5-НТ нейронами DRN во время теста подвешивание за хвост. Напротив, у животных с оптогенетически заторможенной активностью этих нейронов наблюдалась увеличение времени неподвижности по сравнению с контрольными группами. В других исследованиях фармакологическая блокада синтеза 5-НТ параклорфенилаланином [19, 20] предотвращала антидепрессантное действие кетамина в тесте принудительного плавания, но в нашем исследовании кратковременное подавление активности серотонинергических нейронов при помощи оптогенетики привело к превращению эффекта кетамина в про-депрессантный и/или седативный. Важно отметить, что наблюдался некоторый накопительный эффект оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов по мере продолжительности теста подвешивание за хвост у животных с предваритель-

ным введением кетамина, что может быть связано с кинетикой археародопсина, который является протонной помпой [29], и/или режимом освещения.

Системное введение кетамина активирует глутаматергические проекции из PFC идущие в DRN [10]. AMPAR в DRN находятся как на 5-НТ-, так и на ГАМК-ергических нейронах [30]. 5-НТ – и ГАМК-ергические нейроны в DRN получают сигналы как друг от друга, так и из других областей мозга, причем, как возбуждающие, так и тормозные [30]. Конечный эффект на активность нейронов, очевидно, зависит от баланса возбуждающих и тормозных сигналов. В тоже время, неясно, влияют ли глутаматергические проекции mPFC непосредственно на 5-НТ нейроны или через ГАМК-ергические интернейроны, локализованные в DRN. Не исключено также, что в ответ на кетамин вовлекаются не все, а только определенная группа 5-НТ нейронов в DRN, которые имеют проекции в mPFC [12]. Возможно, поэтому неизбирательное ингибирование активности 5-НТ нейронов в DRN в наших опытах могло привести к обращению антидепрессантного действия кетамина в седативный.

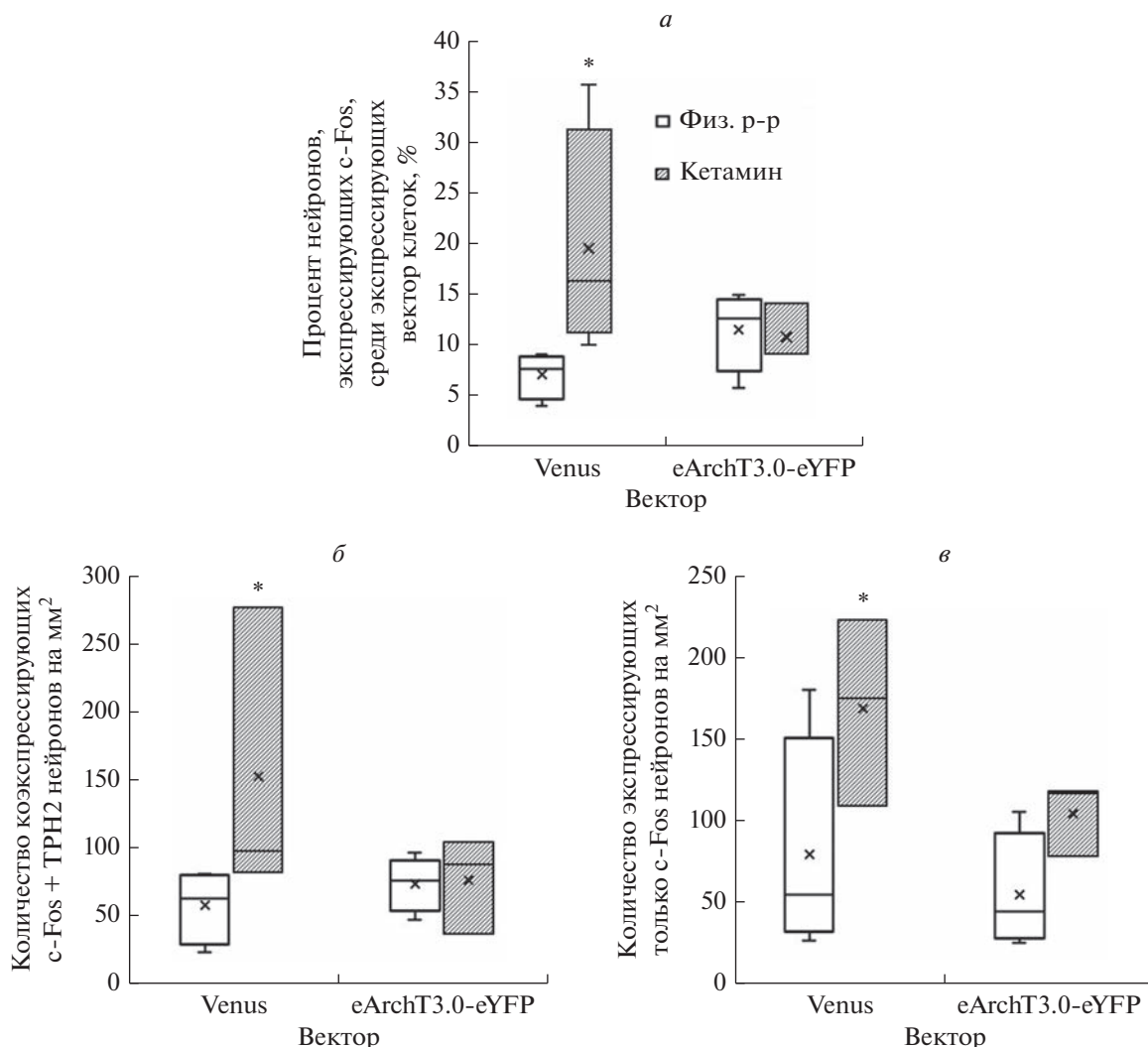


Рис. 4. Изменение экспрессии белка раннего ответа *c-Fos* в нейронах DRN после теста подвешивание за хвост после предварительного введения субанестетической дозы кетамина: *а* — изменение экспрессии *c-Fos* в нейронах DRN, экспрессирующих оптогенетический вектор eArchT3.0-eYFP или контрольный вектор Venus; *б* — изменение экспрессии *c-Fos* в экспрессирующих TRH2 нейронах DRN; *в* — изменение количества экспрессирующих только *c-Fos*, но не вектор и/или TRH2 нейронов DRN. ($n = 4$ (3 в группе “eArchT3.0 × Кетамин”), n = количество животных в группе * <0.05 по сравнению с группой “Venus × физиологический раствор”).

Кроме того, оптогенетическое воздействие предотвращало вызванное кетамином увеличение экспрессии белка раннего ответа *c-Fos*. Ранее уже было показано, что кетамин увеличивает экспрессию *c-Fos* в 5-НТ нейронах DRN [31, 32], однако в нашем исследовании обнаружено, что увеличение экспрессии *c-Fos* после введения кетамина происходит не только в 5-НТ, но и в нейронах, которые не экспрессируют TRH2. Более того, лишь около 42% 5-НТ нейронов экспрессировали светочувствительный белок eArchT3.0-eYFP, но подавление активности этой части нейронов было достаточно для того, чтобы предупредить вызванное кетамином увеличение экспрессии *c-Fos* не только в экспрессирующих вектор клетках, но и в других нейронах DRN. Ранее было показано,

что кетамин не влияет на выброс 5-НТ или активность 5-НТ1A ауторецепторов в DRN [33]. В тоже время, увеличение количества *c-Fos*-позитивных нейронов DRN не являющихся 5-НТ нейронами, может свидетельствовать в пользу вовлечения в механизм действия кетамина взаимодействий в пределах DRN между 5-НТ- и ГАМК-ергическими нейронами, что заслуживает внимания и требует дальнейшего изучения.

Важным аспектом является, что поведение в тесте подвешивание за хвост и экспрессия *c-Fos* в DRN не изменяются после оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов этого ядра у животных, которым вводили физиологический раствор. Ингибирующее активность нейронов оптогенетическое воздействие снижало экспрес-

сию c-Fos в eArchT3.0-eYFP-позитивных 5-НТ нейронах DRN наркотизированных животных [34], но у активно бодрствующих животных такой эффект не наблюдался.

Ранее другая группа исследователей обнаружила, что ингибирование 5-НТ нейронов DRN с помощью того же вектора, что и в нашем исследовании, не влияла на время неподвижности в тесте принудительного плавания. Блокада активности этих нейронов повышала тревожность крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, но не в тесте открытого поля [24]. Напротив, оптогенетическая активация 5-НТ нейронов DRN [24] или возбуждающих проекций mPFC-DRN [16] вызывала в тесте подвешивание за хвост антидепрессантно-подобный эффект. Однако торможение этих проекций также вызывало антидепрессантный эффект в модели социального поражения, что авторы связывали с вовлечением в ответ ГАМК-ергических нейронов [17]. Некоторая противоречивость данных, очевидно, связана с особенностями поведенческих моделей, вызывающих реакции избегания или замирания в зависимости от условий теста. Сложные взаимодействия в сети глутамат-, ГАМК- и 5-НТ нейронов, участвующих в модуляции поведенческого ответа на кетамин [35], также могут способствовать вариативности результатов.

Известно, что разрядная активность нейронов DRN меняется в зависимости от изменения поведения в тесте подвешивание за хвост [36]. Нейроны DRN, экспрессирующие транспортер 5-НТ, были активны, когда животное находилось в домашней клетке, независимо от того, двигалось оно или нет, но во время теста подвешивание за хвост разрядная активность этих нейронов была высокой в мобильных состояниях и низкой в неподвижных состояниях. В тоже время часть экспрессирующих паравалбумин ГАМК-ергических нейронов DRN активны во время периодов неподвижности, тогда как другая их часть не активна [37]. Другими словами, существуют сложные нейронные сети с участием подтипов локальных тормозных нейронов, которые участвуют в регуляции баланса возбуждения и торможения в DRN, которые еще pouco изучены. Наши результаты показывают, что оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов DRN изменяет действие кетамина на поведение в тесте подвешивание за хвост и экспрессию белка c-Fos, но не влияет на эти показатели контрольных животных, что указывает на вероятную тонкую регуляцию сложных взаимодействий между нейронами DRN в обеспечении ответов на ситуации, вызывающие проявления борьбы или отчаяния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые показана ключевая роль активности 5-НТ нейронов DRN в проявлении быстрого антидепрессантного эффекта кетамина

и потенциальная вовлеченность нейронов других нейротрансмиттерных систем DRN в этот эффект. Обращение антидепрессантного действия субанестетической дозы препарата в седативный при блокаде активности 5-НТ нейронов качественно расширяет спектр возможных эффектов кетамина и требует дальнейшего изучения. Полученные данные дополняют имеющиеся сведения о механизме действия кетамина необходимые для разработки следующего поколения более эффективных антидепрессантов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Naoya Nishitani, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto, Japan за любезно предоставленные плазмиды TRH2-eArchT3.0-eYFP-WPRE и TRH2-Venus-WPRE.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0002.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shishkina G.T., Dygalo N.N. // Zh. Vyssh. Nervn. Deyat. im. I.P. Pavlova. 2010. V. 60. № 2. P. 138–152.
2. Liu B., Liu J., Wang M., Zhang Y., Li L. // Frontiers in Cellular Neuroscience. 2017. V. 11. P. 305.
3. Pham T.H., Gardier A.M. // Pharmacology & Therapeutics. 2019. V. 199. P. 58–90.
4. Krystal J.H., Abdallah C.G., Sanacora G., Charney D.S., Duman R.S. // Neuron. 2019. V. 101 № 5. P. 774–778.
5. Yang C., Yang J., Luo A., Hashimoto K. // Translational Psychiatry. 2019. V. 9. № 1. P. 280.
6. Zanos P., Moaddel R., Morris P.J., Riggs L.M., Highland J.N., Georgiou P., Pereira E.F.R., Albuquerque E.X., Thomas C.J., Zarate C.A., Jr. // Pharmacological Reviews. 2018. V. 70. № 3. P. 621–660.
7. Miller O.H., Moran J.T., Hall B.J. // Neuropharmacology. 2016. V. 100. P. 17–26.
8. Nosyreva E., Szabla K., Autry A.E., Ryazanov A.G., Monteggia L.M., Kavalali E.T. // Journal of Neuroscience. 2013. V. 33. № 16. P. 6990–7002.
9. Gerhard D.M., Pothula S., Liu R.J., Wu M., Li X.Y., Girgenti M.J., Taylor S.R., Duman C.H., Delpire E., Picciritto M., Eric S., Wohleb E.S., Duman R.S. // The Journal of Clinical Investigation. 2020. V. 130. № 3. P. 1336–1349.
10. Fukumoto K., Iijima M., Funakoshi T., Chaki S. // Neuropharmacology. 2018. V. 137. P. 96–103.
11. Ago Y., Tanabe W., Higuchi M., Tsukada S., Tanaka T., Yamaguchi T., Igarashi H., Yokoyama R., Seiriki K., Ka-

- sai A., Nakazawa T., Nakagawa S., Hashimoto K., Hashimoto H. // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2019. V. 22. № 10. P. 665–674.
12. López-Gil X., Jiménez-Sánchez L., Campa L., Castro E., Frago C., Adell A. // ACS Chemical Neuroscience. 2019. V. 10. № 7. P. 3318–3326.
13. Tiger M., Veldman E.R., Ekman C.J., Halldin C., Svenningsson P., Lundberg J. // Translational Psychiatry. 2020. V. 10. № 1. P. 159.
14. Du Jardin K.G., Liebenberg N., Cajina M., Müller H.K., Elfving B., Sanchez C., Wegener G. // Frontiers in Pharmacology. 2018. V. 8. P. 978.
15. Nishitani N., Nagayasu K., Asaoka N., Yamashiro M., Shirakawa H., Nakagawa T., Kaneko S. // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2014. V. 17. № 8. P. 1321–1326.
16. Warden M.R., Selimbeyoglu A., Mirzabekov J.J., Lo M., Thompson K.R., Kim S.Y., Adhikari A., Tye K.M., Frank L.M., Deisseroth K. // Nature. 2012. V. 492. P. 428–432.
17. Challis C., Beck S.G., Berton O. // Frontiers in Behavioral Neuroscience. 2014. V. 8. P. 43.
18. Kinoshita H., Nishitani N., Nagai Y., Andoh C., Asaoka N., Kawai H., Shibui N., Nagayasu K., Shirakawa H., Nakagawa T., Kaneko S. // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2018. V. 21. № 3. P. 305–310.
19. Fukumoto K., Iijima M., Chaki S. // Psychopharmacology. 2014. V. 231. № 11. P. 2291–2298.
20. Du Jardin K.G., Liebenberg N., Müller H.K., Elfving B., Sanchez C., Wegener G. // Psychopharmacology. 2016. V. 233. P. 2813–2825.
21. Gigliucci V., O'Dowd G., Casey S., Egan D., Gibney S., Harkin A. // Psychopharmacology. 2013. V. 228. № 1. P. 157–166.
22. Fakhoury M. // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2021. V. 106. P. 110094.
23. Nishitani N., Nagayasu K., Asaoka N., Yamashiro M., Andoh C., Nagai Y., Kinoshita H., Kawai H., Shibui N., Liu B., Hewinson J., Shirakawa H., Nakagawa T., Hashimoto H., Kasparov S., Kaneko S. // Neuropsychopharmacology. 2019. V. 44. № 4. P. 721.
24. McClure C., Cole K.L., Wulff P., Klugmann M., Murray A.J. // JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2011. № 57. P. e3348.
25. Шабурова Е.В., Ланшаков Д.А. // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 5. С. 89–97.
26. Paxinos G., Watson C. // The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, 1998.
27. Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. // Neurobiology of Disease. 2016. V. 91. P. 1–9.
28. Bankhead P., Loughrey M.B., Fernández J.A., Dombrowski Y., McArt D.G., Dunne P.D., McQuaid S., Gray R.T., Murray L.J., Coleman H.G., James J.A., Salto-Tellez M., Hamilton P.W. // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 1–7.
29. Krol A., Lopez-Huerta V.G., Corey T.E., Deisseroth K., Ting J.T., Feng G. // Frontiers in Neural Circuits. 2019. V. 13. P. 4.
30. Pham T.H., Mendez-David I., Defaix C., Guiard B.P., Tritschler L., David D.J., Gardier A.M. // Neuropharmacology. 2017. V. 112. P. 198–209.
31. Fukumoto K., Iijima M., Chaki S. // Neuropsychopharmacology. 2016. V. 41. № 4. P. 1046–1056.
32. Dolzani S.D., Baratta M.V., Moss J.M., Leslie N.L., Tilden S.G., Sørensen A.T., Watkins L.R., Lin Y., Maier S.F. // Eneuro. 2018. V. 5. № 1.
33. Hernández-Vázquez F., Garduño J., Hernández-López S. // Reviews in the Neurosciences. 2019. T. 30. № 3. C. 289–303.
34. Drozd U.S., Lanshakov D.A. // Интегративная физиология. 2020. Т. 1. № 2. С. 144–146.
35. Li Y.F. // Pharmacology & Therapeutics. 2020. V. 208. P. 107494.
36. Seo C., Guru A., Jin M., Ito B., Sleezer B.J., Ho Y.Y., Wang E., Boada C., Krupa N.A., Kullakanda D.S., Shen C.X. // Science. 2019. V. 363. № 6426. P. 538–542.
37. Zhou L., Liu D., Xie Z., Deng D., Shi G., Zhao J., Bai S., Yang L., Zhang R., Shi Y. // Frontiers in Behavioral Neuroscience. 2022. V. 16. P. 200.

Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neurons Activity Is Necessary for the Manifestation of the Antidepressant Effect of Ketamine

U. S. Drozd^{a, b}, D. A. Lanshakov^{a, b}, and N. N. Dygalo^{a, b}

^a Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Mechanisms of the ketamine antidepressant effects observed in humans and laboratory animals are not fully understood. To further clarify the role of the brain serotonergic (5-HT) activity in the drug antidepressant action, optogenetic inhibition of 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus (DRN) was applied. In control animals, a subanesthetic dose of ketamine alleviated their depressive-like behavior in the tail suspension test. Inhibition of 5-HT neurons abolished the drug effect and moreover, a sedative response to ketamine was found under these conditions. Furthermore, optogenetic suppression of the activity of 5-HT neurons prevented the increase in c-Fos expression induced by ketamine both in light-sensitive neurons and in other DRN neurons. The data emphasize the key role of 5-HT neuron activity in the rapid ketamine antidepressant effect.

Keywords: ketamine, depressive-like behavior, tail suspension test, 5-HT, dorsal raphe nucleus, optogenetics, eArchT3.0, lentiviral vector, c-Fos protein

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.21;577.25

ВЛИЯНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ НА ПОВЕДЕНИЕ И МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ МОЗГА МЫШЕЙ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ДЕПРЕССИВНОПОДОБНОМУ ПОВЕДЕНИЮ

© 2023 г. Д. В. Базовкина¹, *, Е. М. Кондаурова¹, С. Н. Адонина¹,
Е. Ю. Баженова¹, А. В. Куликов¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 06.02.2023 г.

После доработки 04.04.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Депрессивные расстройства и алкогольная зависимость являются одними из самых распространенных психопатологий. Известно, что нарушения функционирования серотонинергической и дофаминергической систем мозга лежат в патогенезе алкоголизма и аффективных расстройств. В данной работе изучали эффекты субхронического введения этанола (1.5 г/кг, 20%, 10 дней, внутривентрикулярно) на поведение, функциональную активность рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} и экспрессию генов, кодирующих серотониновые (*Htr1a*, *Htr2a*) и дофаминовые (*Drd1*, *Drd2*) рецепторы, в структурах мозга у мышей линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивноподобному поведению и у мышей родительской “недепрессивной” линии CBA. Показано, что алкоголизация привела к увеличению двигательной активности у животных обеих линий и повышению уровня исследовательского поведения у мышей линии ASC. Не было найдено значимого влияния этанола на социальное и депрессивноподобное поведение. Функциональная активность рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} (определяемая по реакции на введение соответствующих агонистов этих рецепторов) снижалась под действием этанола только у животных линии ASC. У мышей родительской линии CBA, получавших алкоголь, было обнаружено снижение экспрессии гена серотонинового 5-HT_{2A}-рецептора во фронтальной коре. В то же время этанол привел к повышению уровней мРНК гена 5-HT_{1A}-рецептора в стриатуме и гена DRD1-рецептора в гипоталамусе, а также снижению экспрессии гена DRD2-рецептора в гиппокампе у мышей линии ASC. Таким образом, изменения в серотонинергической и дофаминергической системах мозга под действием этанола оказались более значительными у мышей линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивноподобному поведению.

Ключевые слова: этанол, серотонин, дофамин, рецепторы, депрессивноподобное поведение, мозг, мышь

DOI: 10.31857/S1027813323030044, **EDN:** YUKSYI

ВВЕДЕНИЕ

Депрессивные расстройства и алкоголизм представляют собой серьезные психопатологии, распространенные во всем мире [1, 2]. При этом сочетание алкоголизма и депрессии связано с большей тяжестью и худшим прогнозом для обоих расстройств [3]. Было показано, что с одной стороны, алкоголизм в анамнезе является фактором риска депрессивных расстройств, а с другой стороны — у больных с первичной депрессией выше вероятность развития алкоголизма [1, 5, 6]. Следовательно, важной и актуальной задачей является создание адекватных моделей на живот-

ных для изучения этиологии и лечения сочетанных депрессивных расстройств и алкогольной зависимости.

Общим в патогенетической основе алкоголизма и депрессии является недостаточность серотонинергической (5-HT) и дофаминергической (DA) нейротрансмиссии [6–9]. Согласно литературным данным, ключевые элементы HT- и DA-систем мозга, такие как серотониновые 5-HT_{1A}- и 5-HT_{2A}-рецепторы [10, 11], а также дофаминовые DRD1- и DRD2-рецепторы [7, 12], могут играть значительную роль в развитии депрессивных нарушений поведения (в том числе, связанных с потреблением алкоголя) и у человека, и у животных.

Линия мышей ASC была создана в лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН в процессе длительной селекции гибридов ката-

Принятые сокращения: 5-HT — серотонин, DA — дофамин.

* Адресат для корреспонденции: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10, e-mail: daryabazovkina@gmail.com.

лептической линии CBA и некаталептической линии AKR на повышенную предрасположенность к катаlepsии [13, 14]. У мышей линии ASC проявились депрессивноподобные характеристики поведения, такие как снижение двигательной и исследовательской активностей, усиление показателей депрессивноподобного поведения в тестах “принудительное плавание” и “подвешивание за хвост” [13], нарушения в иммунной системе [15]. Кроме этого, было обнаружено, что у мышей линии ASC содержание в структурах мозга нейротрофического фактора BDNF, играющего важную роль в нейрогенезе, значительно ниже, чем у мышей “недепрессивной” линии CBA [16], что согласуется с данными о дефиците BDNF при расстройствах депрессивного спектра [17]. Введение мышам ASC экзогенного BDNF или антидепрессанта флуоксетина приводило к нормализации показателей поведения и 5-HT системы мозга [18, 19].

Ранее было показано, что введение этанола (1.5 г/кг, 20%) в течение 14 дней привело к повышению уровня предшественника proBDNF во фронтальной коре мышей ASC и снижению уровня BDNF в гиппокампе мышей линии CBA [16]. Это свидетельствует о том, что предрасположенность к депрессивноподобному поведению может модулировать эффекты продолжительной алкоголизации на ЦНС. Несмотря на то, что к настоящему времени проведено немало исследований по влиянию этанола на моноаминергические системы мозга, практически нет данных по влиянию хронической алкоголизации на 5-HT- и DA-нейромедиаторные системы, полученных с использованием генетических моделей депрессивноподобного поведения.

Целью работы было исследование эффектов длительной алкоголизации на поведение, функциональную активность рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} и уровни mPFC генов, кодирующих 5-HT- и DA-рецепторы, в структурах мозга у мышей линии ASC с наследственной предрасположенностью к депрессивноподобному поведению и у мышей родительской “недепрессивной” линии CBA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Опыты проводили на взрослых (10–12 нед.) самцах мышей линий CBA ($n = 16$) и ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) ($n = 14$). Вес животных составлял 25 ± 0.7 г, мыши содержались в пластиковых клетках размером $40 \times 30 \times 15$ 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).

Введение этанола и выведение животных из эксперимента. Алкоголизацию проводили посредством внутрибрюшинного введения раствора этанола (1.5 г/кг, 20%, в качестве растворителя использовали физиологический раствор) в течение 10 дней. Выбор дозы алкоголя и времени его действия основывался на наших ранних исследованиях, в которых было показано, что такой способ алкоголизации оказывает генотип-зависимое влияние на экспрессию нейротрофического фактора BDNF и его предшественника proBDNF у мышей CBA и ASC [16, 20]. Данный способ введения позволяет оценить чувствительность к введению этанола на ранних этапах алкоголизации. Мышам контрольной группы вводили растворитель. За день до тестирования поведения мышей рассаживали в индивидуальные клетки, чтобы исключить проявление групповых эффектов. Затем последовательно каждый день проводили тесты поведения и оценку функциональной активности рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A}. Через день после тестирования функциональной активности рецепторов 5-HT_{2A} (на 17-ый день алкоголизации) животных декапитировали, на льду выделяли гипоталамус, фронтальную кору, гиппокамп, стриатум, область среднего мозга. Выбор структур был обусловлен тем, что гипоталамус, фронтальная кора, гиппокамп, стриатум получают серотонинергические и дофаминергические проекции, а область ядер шва среднего мозга является основным местом локализации тел серотониновых нейронов [19, 20]. Образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C до процедуры выделения РНК.

Тесты поведения. Тест “открытое поле” проводили в аппарате, состоящем из круглой арены (40 см в диаметре), окруженной пластиковым бортиком 25 см с инвертированным освещением (двумя галогенными лампами по 12 Вт, расположенными на 40 см ниже нее) и системой компьютерной регистрации “EthoStudio” (Россия). Мышь помещали около бортика и в течение 5 мин регистрировали пройденный путь (м) и время (%) пребывания в центре арены (20 см в диаметре) [21, 22].

Социальное поведение тестировали в модели “резидент–интродер”: в домашнюю клетку экспериментального самца подсаживали ювенильного самца линии Balb/c (возраст 4 нед.). В течение

10 мин с помощью программы EthoStudio фиксировали продолжительность социальных контактов (обнюхивание головы, тела интродера, груминг и следование за ним) [23].

В тесте “подвешивание за хвост” животное подвешивали за хвост с помощью специальной клейкой ленты к установке на высоте 40 см. Поведение животного регистрировали с помощью программы EthoStudio в течение 6 мин. Оценивали уровень депрессивноподобного поведения по времени неподвижности животного [24].

Функциональную активность 5-HT_{1A}-рецепторов оценивали у мышей как было описано ранее [25] — по интенсивности гипотермической реакции на введение агониста этого типа рецепторов 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetraline, Sigma; 1.0 мг/кг, внутривенно). Температуру тела измеряли электронным термометром KJT (Hanna Instruments, Singapore) с помощью ректальных датчиков для мышей (Physitemp Instruments) до и через 20 мин после введения препарата.

Функциональную активность 5-HT_{2A}-рецепторов оценивали как было описано ранее [25] — по числу встряхиваний головой через 5 мин после введения агониста этого типа рецепторов DOI (1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, Sigma; 1.0 мг/кг, внутривенно). Тест проводили в домашней клетке животного и считали количество встряхиваний головой в течение 20 мин.

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 [26, 27].

Реакция обратной транскрипции. Реакцию проводили по протоколу, описанному ранее [26, 27]. 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 1 М 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 MnCl₂ (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 [26, 27]. 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 Ct (значение порогового цикла) — lgP (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 каждого исследуемого гена была представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*rPol2*), выполняющей функцию внутреннего стандарта [26, 27].

Статистика. Результаты представляли как $m \pm \text{SEM}$ и сравнивали в программе STATISTICA 8.0 с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (факторы “генотип” и “этанол”) с последующим с межгрупповым сравнением методом LSD по Фишеру. Нормальность выборок определяли по критерию Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерию Шапиро-Уилка. Достоверными считались различия с $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поведение. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ($F_{1,26} = 16.29$; $p < 0.001$),

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж}$, °C	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>rPol2</i>	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaatttcgtact-3'	60	194
<i>Htr1a</i>	F 5'-ctgtgacctgtttatcgccctg-3' R 5'-gtagtctatagggtcgggtattgc-3'	62	109
<i>Htr2a</i>	F 5'-agaagccacctgtgtgtga-3' R 5'-ttgctcattgctgatggact-3'	61	169
<i>Drd1</i>	F 5'-ggaaaccctgtcgaatgctctc-3' R 5'-ccagccaaaccacacaaatacatcg-3'	64	222
<i>Drd2</i>	F 5'-tccgccacttcttgacatacatg-3' R 5'-cccattccacagcctccttaag-3'	65	203

но не генотипа ($F_{1,26} < 1$) и не взаимодействия факторов ($F_{1,26} < 1$) на длину пройденного пути в тесте “открытое поле”. Анализ межгрупповых сравнений показал, что введение этанола привело к увеличению этого параметра как у мышей линии СВА ($p < 0.05$), так и у животных линии АС ($p < 0.01$) (рис. 1а). Также двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ($F_{1,26} = 10.43$; $p < 0.01$), но не генотипа ($F_{1,26} = 1.87$, $p > 0.05$) и не взаимодействия факторов ($F_{1,26} < 1$) на время, проведенное в центре арены “открытое поле”. Анализ межгрупповых сравнений показал, что получение этанола привело к увеличению этого параметра у мышей линии АС ($p < 0.01$), но не у животных СВА (рис. 1б). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ($F_{1,26} = 5.56$; $p < 0.05$), но не генотипа ($F_{1,26} < 1$) и не взаимодействия факторов ($F_{1,26} < 1$) на продолжительность социальных контактов в тесте социального взаимодействия. Анализ межгрупповых сравнений показал, что этот показатель снизился у мышей линии АС, получавших алкоголь, но лишь на уровне тенденции ($p = 0.07$) (рис. 1в). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа ($F_{1,26} = 9.97$; $p < 0.01$) и взаимодействия факторов ($F_{1,26} = 4.97$; $p < 0.05$), но не этанола ($F_{1,26} < 1$) на продолжительность замирания в тесте “подвешивание за хвост”. Апостериорный анализ выявил только то, что мыши линии АС контрольной группы демонстрировали более высокое время замирания по сравнению с контрольными животными линии СВА ($p < 0.01$) (рис. 1з).

Функциональная активность рецепторов. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа ($F_{1,24} = 6.79$; $p < 0.05$) и этанола ($F_{1,24} = 4.66$; $p < 0.05$), но не взаимодействия факторов ($F_{1,24} = 1.51$, $p > 0.05$) на величину снижения температуры тела после введения агониста 5-НТ1А-

рецептора 8-ОН-ДРАТ. Анализ межгрупповых сравнений показал, что эта разница между начальной и конечной температурами уменьшилась только у мышей линии АС, получавших алкоголь ($p < 0.05$) (рис. 2а). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа ($F_{1,26} = 4.30$; $p < 0.05$), но не этанола ($F_{1,26} = 1.59$, $p > 0.05$) и не взаимодействия факторов ($F_{1,26} = 3.38$, $p = 0.08$) на число встряхиваний головой, вызванных введением агониста 5-НТ2А-рецептора DOI. Анализ межгрупповых сравнений показал, что этот параметр под действием этанола снизился только у мышей линии АС ($p < 0.05$) (рис. 2б).

Экспрессия генов. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов “генотип”, “этанол” и их взаимодействия на уровни мРНК генов серотониновых рецепторов *Htr1a*, *Htr2a* и дофаминовых рецепторов *Drd1*, *Drd2* в структурах мозга мышей линий СВА и АС, подвергавшихся введению этанола, представлены в табл. 2. Анализ межгрупповых сравнений показал, что под действием алкоголя увеличилась экспрессия гена *Htr1a* в стриатуме мышей линии АС ($p < 0.05$). В то же время уровень мРНК гена *Htr2a* во фронтальной коре упал у мышей линии СВА, получавших этанол, по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0.05$) (рис. 3). Также следует отметить, что экспрессия этого гена в стриатуме была выше у животных линии АС по сравнению с контрольными мышами линии СВА ($p < 0.05$) (рис. 3). Анализ межгрупповых сравнений обнаружил, что мыши линии АС, подвергавшиеся действию этанола, демонстрировали рост мРНК гена *Drd1* в гипоталамусе и падение мРНК гена *Drd2* в гиппокампе по сравнению с соответствующей контрольной группой (рис. 4). Также апостериорный анализ показал, что экспрессия гена *Drd2* в стриатуме была выше у животных линии

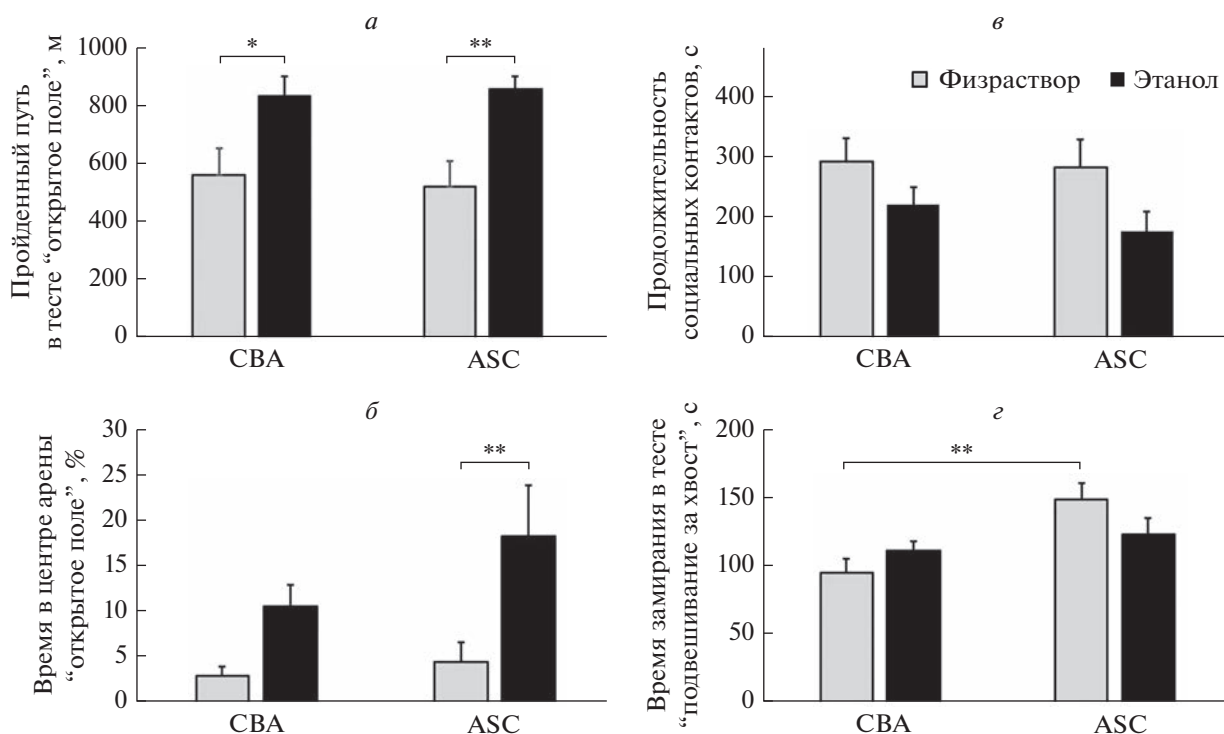


Рис. 1. Влияние субхронического введения этанола на длину пройденного пути (а), продолжительность времени в центре в тесте “открытое поле” (б), продолжительность социальных контактов в тесте социального взаимодействия (в) и продолжительность замирания в тесте “подвешивание за хвост” (г) у мышей линий CBA и ASC. $N = 7-8$ животных в группе. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ASC по сравнению с контрольными мышами линии CBA (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе впервые было проведено комплексное сравнение влияния субхронического введения этанола на поведение, экспрессию генов 5-HT- и DA-рецепторов структурах мозга и функциональную активность рецепторов 5-HT1A и 5-HT2A у мышей с наследственной предрасположенностью к депрессивноподобному поведению и мышей “недепрессивной” линии. Алкоголизация привела к повышению двигательной активности, измеряемой по длине пройденной пути в тесте “открытое поле”, у животных обеих линий. Однако только у мышей ASC введение этанола привело к увеличению времени, проведенному в центре арены “открытое поле”, что можно интерпретировать как повышение исследовательской активности [28] и ослабление тревожноподобного поведения в этом тесте [29]. Литературные данные по влиянию алкоголизации у грызунов на поведение в “открытом поле” неоднозначны. С одной стороны, ряд работ указывает на снижение двигательной активности и повышение тревожности вследствие длительного приема этанола, например, у взрослых самцов мышей линии

C57BL/6J, характеризующейся высоким предпочтением к этанолу [30, 31]. С другой стороны, показано, что у взрослых крыс линии Lewis хроническая алкоголизация (6 мес.) привела к повышению двигательной активности и снижению тревожности в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” [32], что согласуется с нашими результатами. Примечательно, что крысы линии Lewis отличаются повышенной чувствительностью к наркотическим веществам и воспалительным агентам [33].

Что касается влияния алкоголизации на уровень социального поведения у грызунов, то данные по этому вопросу также противоречивы. Есть работы, указывающие на снижение социальных контактов после длительной экспозиции этанолу: например, трехнедельное предьявление алкоголя крысам линии Sprague-Dawley в раннем подростковом периоде (25–45 дней) привело к уменьшению социальных контактов с незнакомым партнером у этих животных в возрасте 10 нед. [34]. Однако в других исследованиях длительная алкоголизация не изменяла параметры социального поведения, например, у самцов линии C57BL/6J, получавших этанол в течение 1 мес. [35]. В нашей работе продолжительность социальных контактов уменьшалась под действием этанола на уровне тенденции только у мышей ASC ($p = 0.07$). Веро-

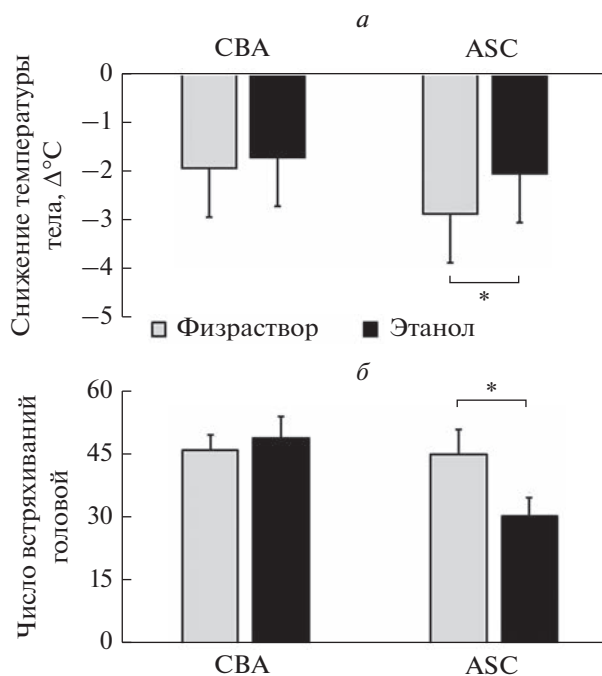


Рис. 2. Влияние субхронического введения этанола на функциональную активность 5-НТ_{1А}-рецепторов (а) и 5-НТ_{2А}-рецепторов (б) у мышей линий СВА и АСВ. Функциональную активность 5-НТ_{1А}-рецепторов оценивали по интенсивности гипотермической реакции на введение агониста 8-ОН-ДРАТ (1.0 мг/кг, внутривенно). Функциональную активность 5-НТ_{2А}-рецепторов оценивали по числу встряхиваний головой после введения агониста DOI (1.0 мг/кг, внутривенно). $N = 7-8$ животных в группе. * $p < 0.05$.

ятно, более продолжительное введение алкоголя могло бы привести к статистически достоверному снижению социального поведения у этих животных.

В нашем исследовании алкоголизация не оказала эффекта на депрессивноподобное поведение у мышей обеих линий, определяемое по продолжительности замирания в тесте “подвешивание за хвост”, в то же время этот показатель у контрольных мышей линии АСВ был выше, чем у животных СВА контрольной группы, что согласуется с нашими ранними результатами [13]. Ряд работ указывают на развитие признаков депрессивноподобного поведения у грызунов после длительной алкоголизации [36–38], однако некоторыми исследователями сообщается, что введение этанола может приводить к антидепрессантным эффектам, так, например, 10-дневное потребление 10% этанола снизило время неподвижности в тесте “принудительное плавание” у крыс, полученных в результате селекции на высокое предпочтение этанола (Sardinian alcohol-preferring rats) [39]. Таким образом, данные литературы и нашей работы указывают на значительный вклад генотипа в поведенче-

ские эффекты хронической и субхронической алкоголизации.

Многочисленными исследованиями было показано, что потребление этанола влияет на регуляцию активности 5-НТ системы мозга. Среди ключевых элементов этой нейромедиаторной системы особый интерес представляют 5-НТ_{1А}- и 5-НТ_{2А}-рецепторы в силу того, что они участвуют в контроле поведения широкого спектра и функций ЦНС [40].

Показано, что вызванная введением 8-ОН-ДРАТ гипотермия отражает у мышей функцию 5-НТ_{1А}-ауторецепторов, которые преимущественно локализованы в области среднего мозга [41]. Снижение этого показателя у мышей АСВ согласуется с данными о гиперсенситизации 5-НТ_{1А}-ауторецепторов у мышей линии С57В1/6 на фоне долговременной алкоголизации, которая, в свою очередь, может быть причиной дефицита нейротрансмиссии 5-НТ [42]. Мы не показали эффекта введения этанола на уровне мРНК гена *Htr1a* в таких структурах, как гипоталамус, фронтальная кора, гиппокамп и средний мозг у животных обеих исследованных линий, что совпадает с нашими ранними результатами по влиянию хронической алкоголизации на экспрессию этого гена у мышей линии С57В1/6 [43]. Однако по данным других авторов долговременная экспозиция этанолу может приводить, например, к снижению мРНК гена *Htr1a* в гиппокампе крыс [44] или увеличению плотности 5-НТ_{1А}-рецепторов в гиппокампе обезьян (без изменений на транскрипционном уровне) [45]. В нашей работе был обнаружен рост экспрессии гена *Htr1a* только в стриатуме мышей линии АСВ, получавших алкоголь. Известно, что 5-НТ_{1А}-рецептор в этой структуре участвует в модуляции дофаминергической нейротрансмиссии [46], а нигростриарный путь играет важную роль в регуляции поведения при развитии наркотических зависимостей (например, социального поведения, тревожности) [47, 48], что частично согласуется с результатами настоящей работы, полученными на мышах АСВ.

Алкоголизация привела к падению уровня мРНК гена *Htr2a* во фронтальной коре мышей СВА и снижению функциональной активности 5-НТ_{2А} рецепторов у животных линии АСВ. Ранее нами было показано, что двухнедельное введение этанола вызвало повышение уровня предшественника proBDNF во фронтальной коре мышей АСВ и снижение уровня BDNF в гиппокампе мышей линии СВА [16]. Зависимость 5-НТ_{2А}-рецепторов от состояния системы BDNF была показана в экспериментах на мышах с нокаутом кодирующего его гена. Так, у гетерозиготных мышей *Bdnf* (+/–) со сниженным содержанием белка BDNF в мозге было обнаружено уменьшение плотности 5-НТ_{2А}-рецепторов в префронталь-

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов “генотип”, “этанол” и их взаимодействия на уровни мРНК генов серотониновых рецепторов *Htr1a*, *Htr2a* и дофаминовых рецепторов *Drd1*, *Drd2* в структурах мозга мышей линий CBA и ASC, подвергавшихся длительному введению этанола

Структура	Генотип	Этанол	Генотип × Этанол
<i>Htr1a</i>			
Гипоталамус	$F_{1,25} = 2.72, p > 0.05$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Фронтальная кора	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
Гиппокамп	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} = 1.53, p > 0.05$	$F_{1,24} = 1.16, p > 0.05$
Стриатум	$F_{1,25} = 4.53, p < 0.05$	$F_{1,25} = 6.11, p < 0.05$	$F_{1,25} < 1$
Средний мозг	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} = 1.17, p > 0.05$	$F_{1,24} < 1$
<i>Htr2a</i>			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Фронтальная кора	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} = 4.56, p < 0.05$
Гиппокамп	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
Стриатум	$F_{1,25} = 9.51, p < 0.01$	$F_{1,25} = 4.50, p < 0.05$	$F_{1,25} < 1$
Средний мозг	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
<i>Drd1</i>			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 5.55, p < 0.05$	$F_{1,25} < 1$
Фронтальная кора	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
Гиппокамп	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
Стриатум	$F_{1,25} = 1.47, p > 0.05$	$F_{1,25} = 3.22, p > 0.05$	$F_{1,25} < 1$
Средний мозг	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
<i>Drd2</i>			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 2.11, p > 0.05$
Фронтальная кора	$F_{1,24} = 3.13, p > 0.05$	$F_{1,24} = 1.48, p > 0.05$	$F_{1,24} < 1$
Гиппокамп	$F_{1,24} = 9.99, p < 0.01$	$F_{1,24} = 5.26, p < 0.05$	$F_{1,24} = 2.83, p > 0.05$
Стриатум	$F_{1,25} = 9.25, p < 0.01$	$F_{1,25} = 1.31, p > 0.05$	$F_{1,25} < 1$
Средний мозг	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$

Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

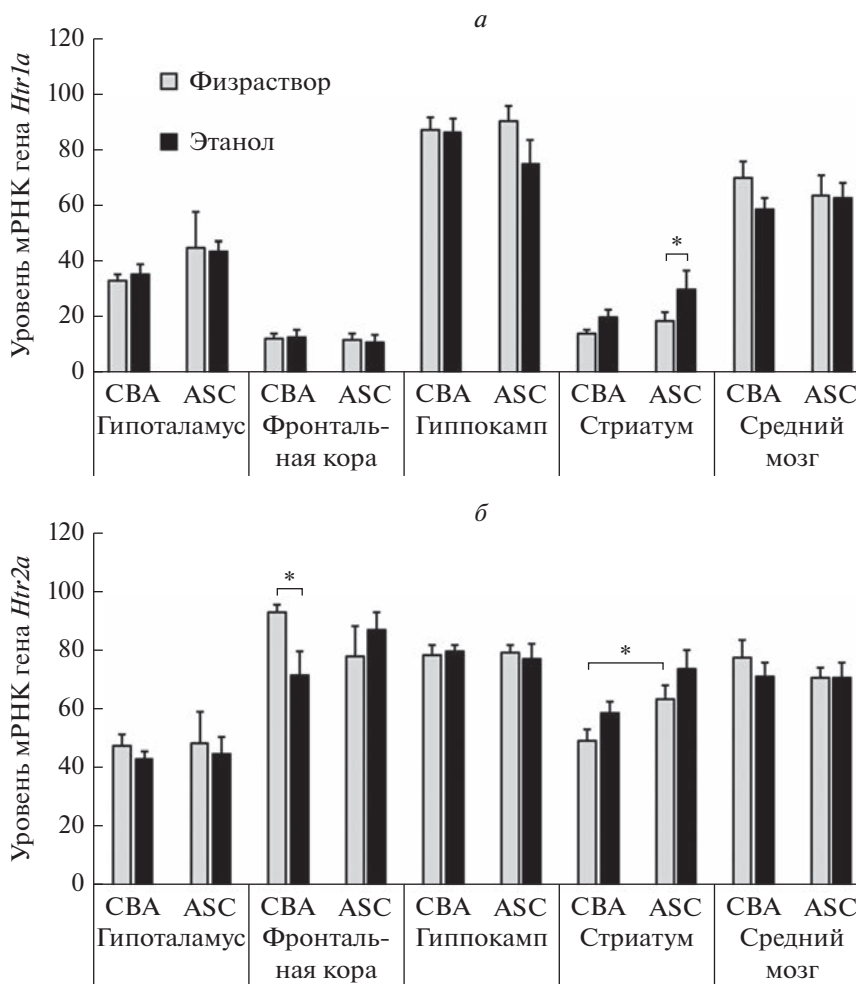


Рис. 3. Влияние субхронического введения этанола на экспрессию генов серотониновых рецепторов *Htr1a* (а) и *Htr2a* (б) в структурах мозга мышей линий CBA и ASC. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2*. $N = 7-8$ животных в группе. * $p < 0.05$.

ной коре и ядрах шва среднего мозга [49]. Следует отметить, что полученные в этой работе результаты согласуются с данными других исследований об алкоголь-индуцированном снижении плотности 5-HT_{2A}-рецепторов в коре крыс [50], а также с нашими другими данными, демонстрирующими снижение экспрессии гена *Htr2a* во фронтальной коре мышей линии C57Bl/6, получавших этанол в течение 6 нед. [43]. Примечательно, что у этих животных одновременно было найдено повышение содержания proBDNF во фронтальной коре и снижение уровня BDNF в гиппокампе [43]. Можно предположить, что влияние введения алкоголя на 5-HT_{2A}-рецепторы в меньшей степени зависит от вклада генотипа и носит общий характер.

Дофаминовые рецепторы D1 и D2 участвуют в регуляции алкоголь-зависимого поведения. Так, DRD1 KO и DRD2 KO мыши демонстрируют значительное снижение потребления этанола по

сравнению с диким типом [51]. Показано, что введение агониста D1-рецептора в паравентрикулярное ядро гипоталамуса облегчает высвобождение кортиколиберина, что может повышать активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой-системы (ГГНС) [52]. Предположительно, повышение экспрессии гена *Drd1* в гипоталамусе мышей ASC, получавших этанол, может свидетельствовать о большем влиянии алкоголя на функции ГГНС у животных этой линии, но данная гипотеза требует дополнительных исследований. Известно, что гиппокамп является частью мезолимбической системы и вовлечен в регуляцию исследовательского и тревожного поведения [53]. В данной работе было показано, что обусловленное этанолом снижение тревожности и увеличение исследовательской активности у мышей линии ASC сопровождается уменьшением уровня мРНК гена *Drd2* в гиппокампе, что согласуется с литературными данными, демонстриру-

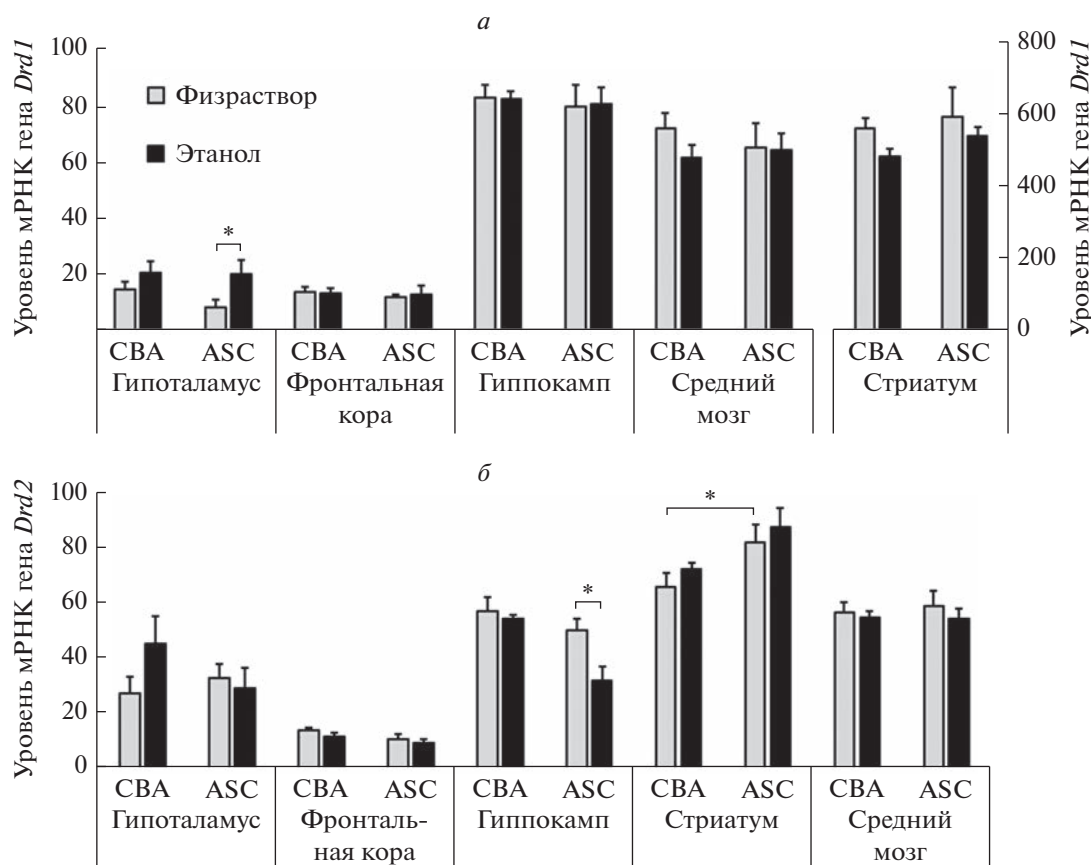


Рис. 4. Влияние субхронического введения этанола на экспрессию генов дофаминовых рецепторов *Drd1* (а) и *Drd2* (б) в структурах мозга мышей линий CBA и ASC. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2*. $N = 7-8$ животных в группе. * $p < 0.05$.

ющими анксиолитический эффект введения антагониста D2 рецепторов в эту структуру у мышей [54].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мыши линии ASC с предрасположенностью к депрессивноподобному поведению продемонстрировали по сравнению с мышами “недепрессивной” линии CBA большую чувствительность к эффектам субхронического введения этанола, как на уровне поведения, так и рецепторов 5-HT и DA нейромедиаторных систем. По результатам настоящей работы, линия мышей ASC имеет большой потенциал для изучения взаимодействия предрасположенности к депрессивноподобному поведению и эффектов алкоголя на центральную нервную систему.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00051). Содержание ли-

ний мышей осуществлялось 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.М. Кондаурова, С.Н. Адонина, Е.Ю. Баженова — проведение экспериментов; Д.В. Базовкина, А.В. Куликов — обсуждение результатов исследования; Д.В. Базовкина — написание текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boden J.M., Fergusson D.M. // *Addiction* (Abingdon, England). 2011. V. 106. P. 906–914.
2. Agabio R., Trogu E., Pani P.P. // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018. V. 4. CD008581.
3. McHugh R.K., Weiss R.D. // *Alcohol Research: Current Reviews*. 2019. V. 40. arcr.v40.1.01.
4. Stephen Rich J., Martin P.R. // *Co-occurring psychiatric disorders and alcoholism / Handbook of Clinical Neurology*, 2014. P. 573–588.
5. Ngui H.H.L., Kow A.S.F., Lai S., Tham C.L., Ho Y.C., Lee M.T. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. P. 14912.
6. McIntosh C., Chick J. // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2004. V. 75. Suppl. 3. P. iii16–iii21.
7. Nutt D.J. // *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2006. V. 67. Suppl. 6. P. 3–8.
8. Marcinkiewicz C.A. // *ACS Chem. Neurosci*. 2015. V. 6. P. 1026–1039.
9. Kraus C., Castrén E., Kasper S., Lanzenberger R. // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2017. V. 77. P. 317–326.
10. Wrzosek M., Jakubczyk A., Wrzosek M., Matsumoto H., Łukaszewicz J., Brower K.J., Wójnar M. // *Pharmacological Reports*. 2012. V. 64. P. 449–453.
11. Underwood M.D., Kassir S.A., Bakalian M.J., Galfalvy H., Dwork A.J., Mann J.J., Arango V. // *Translational Psychiatry*. 2018. V. 8. P. 279.
12. Morgantern I., Tejani-Butt S. // *Neurochemical Research*. 2010. V. 35. P. 1708–1715.
13. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. // *Генетика*. 2005. Т. 41. С. 1222–1228.
14. Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. // *Genes, Brain, and Behavior*. 2008. V. 7. P. 506–512.
15. Альперина Е.Л., Куликов А.В., Попова Н.К., Идова Г.В. // *Бюлл. эксп. биол. мед.*. 2007. Т. 144. P. 188–190.
16. Базовкина Д.В., Кондаурова Е.М., Цыбко А.С., Ковецкая А.И., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С. // *Молекулярная биология*. 2017. Т. 51. № 4. С. 647–655.
17. Duman R.S., Deyama S., Fogaça M.V. // *Eur. J. Neurosci*. 2021. V. 53. P. 126–139.
18. Tikhonova M.A., Alperin, E.L., Tolstikova T.G., Bazovkina D.V., Di V.Y., Iдова G.V., Kulikov A.V., Popova N.K. // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2010. V. 40. P. 521–527.
19. Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Popova N.K. // *Neuroscience*. 2012. V. 214. P. 59–67.
20. Базовкина Д.В., Цыбко А.С., Филимонова Е.А., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С. // *Молекулярная биология*. 2016. Т. 50. № 2. С. 302–310.
21. Куликов А.В., Куликов В.А., Базовкина Д.В. // *Журн. Высш. нервн. деят.*. 2005. Т. 55. № 1. С. 116–122.
22. Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. // *J. Neurosci. Methods*. 2008. V. 170. P. 345–351.
23. Kulikova E.A., Bazovkina D.V., Antonov Y.V., Akulov A.E., Kulikov A.V., Kondaurova E.M. // *Neuroscience Research*. 2017. V. 117. P. 14–21.
24. Kulikova E.A., Moskaliuk V.S., Rodnyy A.Y., Bazovkina D.V. // *Advances in Gerontology*. 2021. Т. 11. № 1. С. 37–43.
25. Bazovkina D., Naumenko V., Bazhenova E., Kondaurova E. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Т. 22. № 21.
26. Науменко В.С., Куликов А.В. // *Молекулярная биология*. 2006. Т. 40. № 1. С. 37–44.
27. Naumenko V.S., Osipova D.V., Kulikov A.V., Kostina E.V. // *Journal of Neuroscience Methods*. 2008. Т. 170. № 2. С. 197–203.
28. Bao X., Qi C., Liu T., Zheng X. // *Behavioural Brain Research*. 2021. V. 414. P. 113483.
29. Krauter A.K., Guest P.C., Sarnyai Z. // *Methods in Molecular Biology*. 2019. V. 1916. P. 99–103.
30. Wang X., Yu H., Wang C., Liu Y., You J., Wang P., Xu G., Shen H., Yao H., Lan X., Zhao R., Wu X., Zhang G. // *Toxicology*. 2020. V. 446. P. 152625.
31. Rath M., Tawfic J., Abrorkhujieva A., Sowell S., Wu S., Eans S.O., Peris J., McLaughlin J.P., Stevens S.M., Liu B. // *Alcohol*. 2021. V. 95. P. 25–36.
32. Blokland A., Prickaerts J., Raaijmakers W. // *Physiology & Behavior*. 1992. V. 51. P. 245–248.
33. Cadoni C. // *Frontiers in Neuroscience*. 2016. V. 10. P. 13.
34. Varlinskaya E.I., Truxell E., Spear L.P. // *Alcohol*. 2014. V. 48. P. 433–444.
35. Pradhan G., Melugin P.R., Wu F., Fang H.M., Weber R., Kroener S. // *Psychopharmacology*. 2018. V. 235. P. 2027–2040.
36. Walker B.M., Drimmer D.A., Walker J.L., Liu T., Mathe A.A., Ehlers C.L. // *Alcohol*. 2010. V. 44. P. 487–493.
37. Boonlert W., Benya-Aphikul H., Umka Welbat J., Rodsiri R. // *Nutrients*. 2017. V. 9. P. 931.
38. Yao H., Shen H., Yu H., Wang C., Ding R., Lan X., Tash D., Wu X., Wang X., Zhang G. // *Physiology & Behavior*. 2021. V. 234. P. 113387.
39. Ciccocioppo R., Panocka I., Frolidi R., Colombo G., Gessa G.L., Massi M. // *Psychopharmacology*, 1999. V. 144. P. 151–157.
40. Sharp T., Barnes, N.M. // *Neuropharmacology* 2020. V. 177. P. 108155.
41. Martin K.F., Phillips I., Hearson M., Prow M.R., Heal D.J. // *Br. J. Pharmacol.* 1992. V. 107. P. 15–21.
42. Kelai S., Renoir T., Chouchana L., Saurini F., Hanoun N., Hamon M., Lanfumey L. // *Journal of Neurochemistry*. 2008. V. 107. P. 1660–1670.
43. Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Antonov E.V., Pershina A.V., Bazovkina D.V., Naumenko V.S. // *Alcohol*. 2020. V. 87. P. 1–15.
44. Kinoshita H., Jessop D.S., Roberts D.J., Hishida S., Harbuz M.S. // *Pharmacology & Toxicology*. 2003. V. 93. P. 100–102.
45. Burnett E.J., Grant K.A., Davenport A.T., Hemby S.E., Friedman D.P. // *Drug and Alcohol Dependence*. 2014. V. 136. P. 135–142.
46. Haleem D.J. // *Behavioural Pharmacology*. 2015. V. 26. P. 45–58.
47. Lago T., Davis A., Grillon C., Ernst M. // *Brain Res*. 2017. V. 1654. P. 177–184.
48. Poisson C.L., Engel L., Saunders B.T. // *Frontiers in Neural Circuits*. 2021. V. 15. P. 752420.

49. *Homberg J.R., Molteni R., Calabrese F., Riva M.A.* // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2014. V. 43. P. 35e47.
50. *Druse M.J., Tajuddin N.F., Ricken J.D.* // Alcoholism, Clinical and Experimental Research. 1997. V. 21. P. 1157–1164.
51. *Le Foll B., Gallo A., Le Strat Y., Lu L., Gorwood, P.* // Behavioural Pharmacology. 2009. V. 20. P. 1–17.
52. *Ran X., Yang Y., Meng Y., Li Y., Zhou L., Wang Z., Zhu J.* // Journal of Chemical Neuroanatomy. 2019. V. 98. P. 97–103.
53. *Bertoglio L.J., Joca S.R., Guimaraes F.S.* // Behav. Brain Res. 2006. V. 175. P. 183–188.
54. *Ebrahimi-Ghiri M., Nasehi M., Zarrindast M.R.* // Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2018. V. 391. P. 1107–1118.

Effect of Subchronic Alcoholization on the Behavior and Monoaminergic Systems of the Brain of Mice with a Predisposition to Depression-Like Behavior

D. V. Bazovkina^a, E. M. Kondaurova^a, S. N. Adonina^a, E. Yu. Bazhenova^a, and A. V. Kulikov^a

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

Depressive disorders and alcohol dependence are among the most common psychopathologies. It is known that disorders in the serotonergic and dopaminergic brain systems functioning lie in the pathogenesis of alcoholism and affective disorders. In this work, we studied the effects of prolonged administration of ethanol (1.5 g/kg, 20%, 10 days, i.p.) on behavior, functional activity of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors and expression of genes encoding serotonin (*Htr1a*, *Htr2a*) and dopamine (*Drd1*, *Drd2*) receptors in brain structures in mice of ASC strain (with the genetic predisposition to depressive-like behavior) and mice of the parental (“non-depressive”) CBA strain. It has been shown that alcoholization leads to an increase in motor activity in animals of both lines and an increase in the level of exploratory behavior in ASC mice. No significant effect of ethanol on social and depression-like behavior was found. The functional activities of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors (determined by the response to the administration of corresponding receptor agonists) were reduced by ethanol only in ASC animals. A decrease in 5-HT_{2A} receptor gene expression was found in the frontal cortex of CBA mice treated with alcohol. At the same time, ethanol led to an increase in the mRNA levels of the 5-HT_{1A} receptor gene in the striatum and the DRD1 receptor gene in the hypothalamus, as well as a decrease in the expression of the DRD2 receptor gene in the hippocampus of ASC mice. Thus, changes in the serotonergic and dopaminergic brain systems induced by chronic ethanol were more significant in ASC mice with a genetic predisposition to depression-like behavior.

Keywords: ethanol, serotonin, dopamine, receptors, depressive-like behavior, brain, mouse

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *TNF-α*, *TNFRSF1A* И *CD40* ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ В ПОПУЛЯЦИИ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2023 г. М. А. Титова^{1, *}, В. М. Алифирова¹, Н. Ф. Мусина¹, Т. Н. Николаева²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Сибирский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кафедра неврологии и нейрохирургии, Томск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Сибирский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации,
неврологическая клиника, Томск, Россия

Поступила в редакцию 31.10.2022 г.

После доработки 19.12.2022 г.

Принята к публикации 19.02.2023 г.

Исследована роль полиморфизмов rs1800629 гена *TNF-α*; rs4149584 гена *TNFRSF1A*; rs6074022, rs1883832, rs1535045, rs11086996 гена *CD40* в развитии, клиническом течении и ответе на лечение при рассеянном склерозе в группе, состоящей из 152 больных, проживающих в Томской области. В контрольную группу вошли 707 добровольцев без аутоиммунных заболеваний и патологии нервной системы. Достоверную связь с риском развития рассеянного склероза продемонстрировал аллель С полиморфизма rs6074022 гена *CD40*, который в то же время оказывал влияние на развитие более высокой скорости прогрессирования заболевания. Аллель Т полиморфизма rs6074022 гена *CD40* показал достоверную связь со средней скоростью прогрессирования болезни, а генотип GA полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* был ассоциирован с более высокой среднегодовой частотой обострений РС. Остальные исследуемые полиморфизмы не продемонстрировали достоверной связи как с риском развития болезни, так и с клиническими особенностями заболевания и ответом на лечение.

Ключевые слова: рассеянный склероз, полиморфизм, ген, фактор некроза опухоли

DOI: 10.31857/S1027813323020152, **EDN:** UDCNUJ

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) — хроническое воспалительное демиелинизирующее заболевание нервной системы в возникновении которого несомненную роль играет генетическая предрасположенность наряду с воздействием средовых факторов [1, 2]. Генетические исследования в области РС выявили, что предрасположенность к болезни реализуется полигенной системой, формирующей иммунный ответ, а особенности клинического фенотипа заболевания и ответа на лечение могут определяться вовлечением полиморфизмов гораздо большего числа генов [3, 4]. Среди генетических факторов, определяющих как развитие, так и течение РС, наиболее подтвержденной на сегодняшний день, является роль генов иммунной системы, однако в разных регионах сочетание полиморфных ассоциаций с РС демонстрирует определенные различия [5]. Данные о генетической гетерогенности РС стимулируют множество исследований по поиску отдельных связей поли-

морфизмов генов с риском развития заболевания, его клиническим течением, ответом на терапию в различных популяциях, которые вносят все больший вклад в понимание генетики РС. При этом, наиболее активно изучается роль полиморфизмов генов различных цитокинов в формировании клинико-патогенетических вариантов болезни [6]. Среди провоспалительных цитокинов особое внимание уделяется семейству фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF). Ген фактора некроза опухоли-α (*TNF-α*) является главным регулятором синтеза провоспалительных цитокинов и рассматривается в качестве одного из ключевых генов в патогенезе РС. Он представлен одной копией на б-хromosome человека (6p21.1-3) [7], а аллель А полиморфного локуса rs1800629 в положении G-308A этого гена ассоциирован с более высокой генной транскрипцией *TNF-α* и усилением воспалительных процессов [8]. Исследования этого полиморфизма при РС показали ассоциации аллеля А с двукратным увеличением риска заболевания у женщин, более ранним его дебютом [9], выраженными когнитивными расстройствами [10], а также с высокой степенью

* Адресат для корреспонденции: 634050, Томск, Московский тракт, д. 2, e-mail: titovam82@list.ru.

инвалидизации пациентов [11]. Одним из основных белков рецептора *TNF-α* является *TNFRSF1A*, который активирует фактор транскрипции NF-κB, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла, опосредует апоптоз и регулирует воспаление. Ген *TNFRSF1A* картирован на 12й хромосоме (12p13.2) и имеет 2 независимых аллеля, ассоциированные с риском развития РС [12]. Полиморфизм rs4149584 кодирует *TNF-R1*, один из основных рецепторов *TNF-α*, который опосредует его воспалительные действия при аминокислотной замене R92Q [13]. Обнаружено, что сывороточные уровни растворимого *TNF-R1* и уровни мРНК полноразмерного рецептора значительно повышены у пациентов с РС, несущих именно эту рисковую мутацию [14], однако влияние полиморфизма rs4149584 гена *TNFRSF1A* на формирование фенотипа РС и ответа на лечение остается невыясненным. *CD40* — это поверхностный рецептор *TNF*, экспрессирующийся на многих клетках организма человека и животных. Ген рецептора *CD40* локализован на 20-й хромосоме (20q11-13) и вносит вклад в предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям. Вовлечение *CD40* в патогенез РС реализуется посредством нарушения негативной селекции в тимусе, высвобождения активированных Т-клеток, их дифференциации в Th17, активации антиген-презентирующих клеток, стимуляции воспалительных хемокинов и цитокинов в тканях-мишенях, что приводит воспалительному повреждению ткани-мишени [15]. Связь гена *CD40* (rs6074022, rs1569723) с риском РС впервые была выявлена в результате полногеномного исследования, проведенного консорциумом ANZgene [16]. Позднее был проведен еще ряд исследований, касающихся отдельных полиморфизмов rs1883232, rs1535045, rs11086996, rs6074022, находящихся в одном блоке сцепления гена *CD40*, показавших противоречивые результаты о связи с риском РС, тем самым подтвердив генетическую гетерогенность РС в разных популяциях пациентов [17, 18]. Результаты крупномасштабного иммуногенетического исследования, проведенного международным консорциумом по генетике РС, в очередной раз подтвердили участие описанных генов семейства *TNF* в качестве генов-кандидатов, определяющих восприимчивость к РС [19].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования были выбраны 6 полиморфизмов генов семейства *TNF*: rs1800629 гена *TNF-α*; rs4149584 гена *TNFRSF1A*; rs6074022, rs1883832, rs1535045, rs11086996 гена *CD40*, которые показали ассоциации с РС в проведенных ранее исследованиях [9–12, 14, 16–19]. Все изучаемые варианты являются однонуклеотидными заменами (single nucleotide polymorphism, SNP). Поскольку

прямое влияние на развитие иммунных воспалительных процессов оказывает взаимодействие между цитокинами, рецепторами, экспрессируемыми на Т-клетках, и лигандами, в исследование были включены гены этих трех представителей семейства *TNF*: *TNF-α*, являющийся провоспалительным цитокином; поверхностный рецептор *TNFRSF1A*; поверхностный рецептор *CD40*, являющийся ко-стимулирующим фактором.

Исследуемую группу составили 152 пациента с достоверным диагнозом РС согласно критериям МакДоналда [20], проживающие на территории Томской области, средний возраст которых составил 35.0 ± 11.2 лет. В исследуемой группе преобладали женщины (соотношение полов составило 1.9 : 1), медиана длительности болезни составила 12 [9, 18] лет, средний балл по шкале EDSS равнялся 3.3 ± 1.7 . Подробная характеристика группы больных представлена в табл. 1. Исследование ассоциаций изучаемых полиморфизмов с ответом на лечение проводилось среди пациентов, получавших терапию препаратами, изменяющими течение РС (ПИТРС) первой и второй линии. Обязательными условиями при включении в исследуемую группу были: лечение препаратом ПИТРС в течение времени, необходимого для наступления терапевтического эффекта и достаточная приверженность лечению со стороны пациента. В подгруппу ПИТРС первой линии вошли 134 пациента, получавшие терапию на момент включения в исследование, из которых 89 пациентов лечились глатирамером ацетатом и 45 — интерферонами-бета. В подгруппу ПИТРС второй линии вошли 38 больных, из которых 18 получали ПИТРС второй линии на момент включения в исследование и 20 больных были переведены на данный вид терапии в течение периода клинического наблюдения в связи с недостаточной эффективностью или плохой переносимостью препаратов первой линии. В группе ПИТРС второй линии 20 больных получали натализумаб, 10 — окрелизумаб, 4 — финголимод, 3 — митоксантрон и 1 — алемтузумаб. Период клинического наблюдения группы больных РС для оценки степени прогрессирования РС и ответа на терапию ПИТРС составил 5 лет.

В контрольную группу вошли 707 добровольцев, не имеющих аутоиммунных заболеваний и патологии нервной системы, из которых 442 женщины и 265 мужчин (соотношение полов 1.7 : 1), средний возраст составил 34.9 ± 8.9 лет. Контрольная группа соответствовала по полу и возрасту ($p > 0.05$) группе больных РС.

ДНК выделяли из венозной крови с использованием стандартной процедуры, включающей выделение и лизис клеток крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку экстракцией примесей фенол–хлороформом и осаждение этанолом. Генотипирование проводилось методом ПЦР в ре-

Таблица 1. Клиническая характеристика группы больных РС, принявших участие в исследовании

Показатель	Значение
Возраст, годы ($M \pm SD$)	35.0 ± 11.2
Женщины/мужчины (соотношение полов)	101/51 (1.9 : 1)
Тип течения: РРС/ВППС/ППРС	85/55/12
Возраст дебюта, годы*	24 [20; 30]
Инвалидизация по EDSS, баллы ($M \pm SD$)	3.3 ± 1.7
Скорость прогрессирования, баллов/год*	0.33 [0.22; 0.50]
Длительность заболевания, годы*	12 [9, 18]
Длительность первой ремиссии, месяцы*	10 [6, 12]
Среднегодовая частота обострений, ($M \pm SD$)	0.81 ± 0.95

Примечание: РРС — ремиттирующий рассеянный склероз; ВППС — вторично-прогрессирующий рассеянный склероз; ППРС — первично-прогрессирующий рассеянный склероз; M — среднее, SD — стандартное отклонение среднего; EDSS — расширенная шкала инвалидизации. * Данные приведены в формате: медиана (нижняя квартиль; верхняя квартиль).

жиге реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфной нуклеотидной последовательности.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 12.0 (для Windows) и скриптового языка программирования R 4.2.0 в среде RStudio 1.2.5001 с применением специальных прикладных пакетов. Для проверки на соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вейнберга использовался критерий хи-квадрат Пирсона (χ^2). Ассоциативный анализ частот генотипов и аллелей проводился с помощью критерия χ^2 . Если предпосылки применения данного критерия не выполнялись, применялся точный критерий Фишера. Для оценки ассоциаций использовался стандартный уровень значимости $p < 0.05$. Для сравнения значений показателей в более, чем двух выборках, несоответствующих нормальному закону распределения, использовался критерий Краскела–Уоллиса. Оценку потенциальных эффектов полиморфных вариантов генов на формирование патологического фенотипа проводили с помощью расчета показателя отношения шансов (odds ratio; OR) с 95%-м доверительным интервалом (95% CI).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение генотипов всех изученных полиморфизмов генов семейства TNF у больных РС и контрольных лиц соответствовало ожидаемому согласно равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0.05$). Анализ полученных результатов по распределению генотипов исследуемых генов показал связь аллеля С полиморфного локуса rs6074022 гена CD40 с риском развития заболевания (OR = 1.38; 95% ДИ [1.05–1.81]; $p = 0.02$). Рисковые аллели остальных выбранных локусов генов семейства

TNF достоверной связи с развитием РС в исследуемой популяции не продемонстрировали (табл. 2).

С учетом того, что риск развития РС напрямую связан с половой принадлежностью (у женщин РС возникает в 2–3 раза чаще, чем у мужчин), мы сравнили распределение частот полиморфизмов исследуемых локусов генов семейства TNF в зависимости от пола больных РС, однако достоверной связи генотипов и аллелей исследуемых полиморфизмов с полом выявлено не было.

Следующим этапом был проведен поиск ассоциаций исследуемых полиморфизмов с отдельными клиническими проявлениями РС, такими как: тип, характер и возраст дебюта заболевания, тип течения, переход во вторичное прогрессирование, скорость прогрессирования болезни, среднегодовая частота обострений. Мы обнаружили достоверную связь генотипа ТТ ($\chi^2 = 10.28$; $p = 0.036$) и аллеля Т ($\chi^2 = 11.4$; $p = 0.004$) полиморфизма rs6074022 гена CD40 со средней скоростью прогрессирования РС (табл. 3). При этом, в группе больных РС носителей генотипа СС у 8 из 14 пациентов (57.14%) наблюдалась высокая скорость прогрессирования РС, у гетерозигот с генотипом ТС доля больных с высокой скоростью прогрессирования составила 47.83% (33 из 69 больных), а у гомозигот ТТ высокая скорость прогрессирования РС имела место лишь у 17.39% (12 из 69) больных. Полученные данные свидетельствуют о влиянии аллеля С на более неблагоприятную клиническую картину РС, однако за счет редкой встречаемости аллеля С, и в особенности, генотипа СС в популяции (генотип СС встречался только у 14 (9.21%) из 152 больных) получить достоверные статистические различия по связи аллеля С со скоростью прогрессирования РС не удалось. Также была выявлена достоверная связь генотипа ГА полиморфизма rs1800629 гена TNF- α с более высокой среднегодовой частотой обострений РС по срав-

Таблица 2. Частоты встречаемости генотипов полиморфных локусов исследуемых генов семейства TNF у больных РС и контрольной группы, абс.

SNP	PC			Контроль			Risk allele: OR знач., [95% ДИ], <i>p</i>
TNF-α							
rs1800629	A/A 0	G/A 24	G/G 128	A/A 0	G/A 127	G/G 580	A: 0.68 [0.23–2.13] <i>p</i> = 0.86
TNFRSF1A							
rs4149584	A/A 0	G/A 23	G/G 129	A/A 0	G/A 106	G/G 600	A: 0.85 [0.31–1.59] <i>p</i> = 0.94
CD40							
rs6074022	T/T 69	T/C 69	C/C 14	T/T 408	T/C 255	C/C 44	C: 1.38 [1.05–1.81] <i>p</i> = 0.02
rs1883832	C/C 85	C/T 56	T/T 11	C/C 470	C/T 249	T/T 41	T: 1.24 [0.94–1.65] <i>p</i> = 0.14
rs1535045	C/C 73	C/T 68	T/T 11	C/C 388	C/T 276	T/T 43	T: 1.22 [0.93-1.61] <i>p</i> = 0.15
rs1108996	C/C 148	C/G 4	G/G 0	C/C 683	C/G 24	G/G 0	G: 0.77 [0.27–2.24] <i>p</i> = 0.81

Примечание: *p* – уровень статистической значимости; OR – отношение шансов; 95% ДИ – 95%-й доверительный интервал.

Таблица 3. Сравнение частот генотипов и аллелей рискового полиморфизма rs6074022 гена *CD40* в зависимости от скорости прогрессирования РС, абс. (%)

Ген (SNP)	Генотип/ аллель	Скорость прогрессирования			χ^2	<i>p</i>
		низкая <i>n</i> = 38	средняя <i>n</i> = 61	высокая <i>n</i> = 53		
<i>CD40</i> (rs6074022)	CC	4 (10.53)	2 (3.28)	8 (15.09)	10.2801	0.04
	TC	20 (52.63)	16 (26.23)	33 (62.27)		
	TT	14 (36.84)	43 (70.49)	12 (22.64)		
	C	28 (36.84)	20 (16.39)	49 (46.23)	11.407	0.004
	T	48 (63.16)	102 (83.61)	57 (53.77)		

Примечание: χ^2 – критерий χ -квадрат Пирсона; *p* – уровень статистической значимости.

нению с генотипом GG (0,41 [0.27; 0.51] и 0.33 [0.23; 0.50] обострений/год, соответственно, *p* = 0.03).

Следующая задача нашего исследования состояла в поиске ассоциаций полиморфизмов изучаемых генов с ответом на терапию ПИТРС. Поиск ассоциаций проводился путем сравнения частот генотипов и аллелей исследуемых полиморфизмов в подгруппах пациентов с оптимальным, субоптимальным ответом и отсутствием ответа на проводимое лечение ПИТРС согласно критериям No Evidence of Disease Activity-3 (NEDA-3) [21]. В подгруппе пациентов, получавших ПИТРС первой линии оптимальный ответ на терапию наблюдался у 61 больного, субоптимальный – у 65, отсутствие ответа – у 8. Оптимальный ответ на лечение ПИТРС второй линии демонстрировали 12

пациентов, субоптимальный – 14 и отсутствие ответа зафиксировано у 12 человек. В результате проведенного анализа ни один из исследуемых полиморфизмов генов семейства TNF не показал достоверной связи с ответом на лечение ПИТРС в исследуемой популяции (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проводя сравнение полученных нами данных с опубликованными ранее работами следует отметить, что в исследовании, проведенном на популяции в 1679 больных РС, проживающий в разных городах Российской Федерации также была показана достоверная связь аллеля С полиморфного локуса rs6074022 гена *CD40* с риском возник-

Таблица 4. Сравнение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов исследуемых генов семейства TNF в зависимости от ответа на терапию ПИТРС, абс. (%)

Ген (SNP)	Генотип/аллель	Ответ на терапию ПИТРС			<i>p</i>
		оптимальный	субоптимальный	нет ответа	
ПИТРС первой линии					
<i>TNF-α</i> (rs1800629)	GG	49 (80.33)	55 (84.62)	8 (100.00)	0.35
	GA	12 (19.67)	10 (15.38)	0 (0)	
	G	110 (90.16)	120 (92.31)	16 (100.00)	0.39
	A	12 (9.84)	10 (7.69)	0 (0)	
<i>CD40</i> (rs6074022)	CC	7 (11.48)	5 (7.692)	0 (0)	0.33
	TC	22 (36.07)	30 (46.154)	6 (75.00)	
	TT	32 (52.46)	30 (46.154)	2 (25.00)	0.80
	C	36 (29.51)	40 (30.77)	6 (37.50)	
<i>TNFRSF1A</i> (rs4149584)	T	86 (70.49)	90 (69.23)	10 (62.50)	0.06
	GG	49 (80.33)	59 (90.77)	5 (62.50)	
	GA	12 (19.67)	6 (9.23)	3 (37.15)	0.07
	G	110 (90.16)	124 (95.38)	13 (81.25)	
A	12 (9.84)	6 (4.62)	3 (18.75)		
ПИТРС второй линии					
<i>TNF-α</i> (rs1800629)	GG	10 (83.33)	8 (57.14)	11 (91.67)	0.10
	GA	2 (16.67)	6 (42.86)	1 (8.33)	
	G	22 (91.67)	22 (78.57)	23 (95.83)	0.17
	A	2 (8.33)	6 (21.43)	1 (4.17)	
<i>CD40</i> (rs6074022)	CC	1 (8.33)	0 (0.00)	0 (0.00)	0.56
	TC	5 (41.67)	8 (57.14)	8 (66.67)	
	TT	6 (50.00)	6 (42.86)	4 (33.33)	0.92
	C	7 (29.17)	8 (28.57)	8 (33.33)	
<i>TNFRSF1A</i> (rs4149584)	T	17 (70.83)	20 (71.43)	16 (66.67)	1
	GG	11 (91.67)	12 (85.71)	10 (83.33)	
	GA	1 (8.33)	2 (14.29)	2 (16.67)	1
	G	23 (95.83)	26 (92.86)	22 (91.67)	
A	1 (4.17)	2 (7.14)	2 (8.33)		

Примечание: *p* – уровень статистической значимости.

новения заболевания, наряду с аллелем Т локуса rs1883832 этого же гена [18], однако в нашей популяции больных связи локуса rs1883832 с развитием РС обнаружено не было. В группе больных, проживающих на территории Новосибирской области, наблюдалась обратная ситуация – с РС достоверную связь продемонстрировал аллель Т локуса rs1883832 гена *CD40*, а локус rs6074022 связи с риском развития болезни не показал [22]. В популяции же Алтайского края ни один из исследуемых полиморфизмов не показал значимых ассоциаций с РС [23]. Разница в полученных данных может быть объяснена высокой генетической гетерогенностью РС в популяциях больных, проживающих даже на близко расположенных территориях. Еще в одном исследовании, проведен-

ном в популяции пациентов с РС Иордании, была выявлена связь полиморфизмов rs1883832 и rs6074022 гена *CD40* с низким уровнем витамина D в сыворотке больных, но связи с риском развития болезни обнаружено не было [17].

Аллель С полиморфизма rs6074022 гена *CD40* в популяции Томской области не только показал связь с риском развития РС, но и влияние на развитие более высокой скорости прогрессирования заболевания, а аллель Т этого полиморфизма в свою очередь достоверно связан со средней скоростью прогрессирования РС. Подобные результаты о негативном влиянии аллеля С на скорость прогрессирования РС были получены в исследовании, проведенном на популяции Новосибирской

области, по результатам которого носительство аллеля С полиморфизма rs6074022 увеличивало скорость прогрессирования на 0.14 ± 0.06 баллов/год ($p = 0.01$) [22].

Полученные нами данные о связи генотипа GA полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* с более высокой частотой обострений РС также подтверждают опубликованные ранее данные о влиянии рискованного аллеля А этого полиморфизма на неблагоприятное течение РС [10, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги проведенного нами поиска ассоциаций полиморфизмов исследуемых генов цитокинов, относящихся к семейству TNF (rs1800629 гена *TNF-α*; rs4149584 гена *TNFRSF1A*; rs6074022, rs1883832, rs1535045, rs11086996 гена *CD40*), можно заключить, что из выбранных полиморфизмов генов связь с риском развития РС показал редкий аллель С полиморфизма rs6074022 гена *CD40*. Этот же аллель оказывает влияние и на развитие более высокой скорости прогрессирования болезни. Достоверную связь со средней скоростью прогрессирования РС в популяции больных Томской области демонстрирует аллель Т этого же полиморфизма rs6074022 гена *CD40*, а генотипа GA полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* ассоциирован с более высокой частотой обострений РС. Остальные полиморфизмы исследуемых нами полиморфизмов генов семейства TNF не показали достоверной связи как с риском развития болезни, так и с клиническими особенностями заболевания и ответом на терапию ПИТРС первой и второй линий.

Таким образом, на основании описанных ранее и полученных нами данных можно сделать вывод о несомненном участии генов семейства TNF в развитии и формировании клинического фенотипа РС, однако необходимо продолжать поиски, чтобы получить большее количество информации по влиянию полиморфизмов генов цитокинов на РС в разных популяциях больных и пополнять базу знаний о роли этой группы генов в развитии и течении болезни.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Лабораторная часть исследования поддержана в рамках Российской федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (2012-1.5-12-000-1002). Государственный контракт №8490.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике, Хельсинкской декларации 1964 года с ее последующими изменениями и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России 24.02.2014 г., заключение № 3604.

Информированное согласие. От каждого участника исследования было получено добровольное информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baranzini S.E., Oksenberg J.R. // Trends Genet. 2017. V. 33. № 12. P. 960–970.
2. Alfredsson L., Olsson T. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2019. V. 9. № 4. P. a028944.
3. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler D.A., Compston A., Sawcer S., Lander E.S., Daly M.J., De Jager P.L., De Bakker P.I., Gabriel S.B., Mirel D.B., Iverson A.J., Pericak-Vance M.A., Gregory S.G., Rioux J.D., McCauley J.L., Haines J.L., Barcellos L.F., Cree B., Oksenberg J.R., Hauser S.L. // N. Engl. J. Med. 2007. V. 357. № 9. P. 851–862.
4. Dashti M., Ateyah K., Alroughani R., Al-Temaimi R. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 7327.
5. Cree B.A. // Handb. Clin. Neurol. 2014. V. 122. P. 193–209.
6. Didonna A., Oksenberg J.R. // Clin. Chim. Acta. 2015. V. 449. P. 16–22.
7. Nedwin G.E., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Smith D., Jarrett-Nedwin J., Pennica D., Goeddel D.V., Gray P.W. // Nucleic. Acids. Res. 1985. V. 13. № 17. P. 6361–6373.
8. Braun N., Michel U., Ernst B.P., Metzner R., Bitsch A., Weber F., Rieckmann P. // Neurosci. Lett. 1996. V. 215. № 2. P. 75–78.
9. Grigorova A.A., Trenova A.G., Stanilova S.A. // Neurol. Res. 2021. V. 43. № 4. P. 291–298.
10. Trenova A.G., Miteva L.D., Stanilova S.A. // J. Neuroimmunol. 2020. V. 347. P. 577357.
11. Bakr N.M., Hashim N.A., El-Baz H.A.E., Khalaf E.M., Elharoun A.S. // Mult. Scler. Relat. Disord. 2021. V. 47. P. 102654.
12. De Jager P.L., Jia X., Wang J., De Bakker P.I., Ottoboni L., Aggarwal N.T., Piccio L., Raychaudhuri S., Tran D., Aubin C., Briskin R., Romano S., International MS Genetics Consortium, Baranzini S.E., McCauley J.L., Pericak-Vance M.A., Haines J.L., Gibson R.A., Naeglin Y., Uitendaa B., Matthews P.M., Kappos L., Polman C., McArdle W.L., Strachan D.P., Evans D., Cross A.H., Daly M.J., Compston A., Sawcer S.J., Weiner H.L., Hauser S.L., Hafler D.A., Oksenberg J.R. // Nat. Genet. 2009. V. 41. № 7. P. 776–782.
13. Agulló L., Malhotra S., Fissolo N., Montalban X., Comabella M. // J. Neuroimmunol. 2015. V. 289. P. 12–20.
14. Caminero A., Comabella M., Montalban X. // Clin. Exp. Immunol. 2011. V. 166. № 3. P. 338–345.

15. *Fadul C.E., Mao-Draayer Y., Ryan K.A., Noelle R.J., Wishart H.A., Channon J.Y., Kasper I.R., Oliver B., Mielcarz D.W., Kasper L.H.* // *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2021. V. 8. № 6. P. e1096.
16. *Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene)* // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 7. P. 824–828.
17. *Al-Eitan L., Qudah M.A., Qawasmeh M.A.* // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 3. P. 356.
18. *Sokolova E.A., Malkova N.A., Korobko D.S., Rozhdestvenskii A.S., Kakulya A.V., Khanokh E.V., Delov R.A., Platonov F.A., Popova T.Y., Arefeva E.G., Zagorskaya N.N., Alifirova V.M., Titova M.A., Smagina I.V., El'chaninova S.A., Popovtseva A.V., Puzyrev V.P., Kulakova O.G., Tsareva E.Y., Favorova O.O., Shchur S.G., Lashch N.Y., Popova N.F., Popova E.V., Gusev E.I., Boyko A.N., Aulchenko Y.S., Filipenko M.L.* // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 4. P. e61032.
19. *International Multiple Sclerosis Genetics Consortium.* // *Science.* 2019. V. 365. № 6460. P. eaav7188.
20. *Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W.M., Coetzee T., Comi G., Correale J., Fazekas F., Filippi M., Freedman M.S., Fujihara K., Galetta S.L., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Marrie R.A., Miller A.E., Miller D.H., Montalban X., Mowry E.M., Sorensen P.S., Tintoré M., Traboulsee A.L., Trojano M., Uitdehaag B.M.J., Vukusic S., Waubant E., Weinshenker B.G., Reingold S.C., Cohen J.A.* // *Lancet Neurol.* 2018. V. 17. № 2. P. 162–173.
21. *Pandit L.* // *Ann. Indian. Acad. Neurol.* 2019. V. 22. № 3. P. 261.
22. *Коробко Д.С., Малкова Н.А., Булатова Е.В., Бабенко Л.А., Сазонов Д.В., Соколова Е.А., Филипенко М.Л.* // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2013. Т. 113. № 2–2. С. 10–16.
23. *Смагина И.В., Ельчанинова С.А., Золоткина А.Г., Игнатова Ю.Н., Кудрявцева Е.А.* // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2011. Т. 111. № 5. С. 42–45.

The Role of *TNF-α*, *TNFRSF1A*, and *CD40* Genes Polymorphisms in Multiple Sclerosis in Tomsk Region

M. A. Titova^a, V. M. Alifirova^a, N. F. Musina^a, and T. N. Nikolaeva^b

^a *Siberian State Medical University, Neurology and Neurosurgery Department, Tomsk, Russia*

^b *Siberian State Medical University, Neurology Clinic, Tomsk, Russia*

We studied the role of polymorphisms rs1800629 of the *TNF-α* gene; rs4149584 of the *TNFRSF1A* gene; rs6074022, rs1883832, rs1535045, rs11086996 of the *CD40* gene in the onset, clinical course and response to treatment in multiple sclerosis (MS) in a group of 152 patients, living in Tomsk region. 707 volunteers without autoimmune diseases and pathology of the nervous system were included in control group. The allele C of the rs6074022 polymorphism of *CD40* gene was associated with the risk of MS and contributed to the high rate of disease progression. The T allele of the rs6074022 polymorphism of *CD40* gene showed a significant association with the average rate of disease progression, and the GA genotype of rs1800629 polymorphism of *TNF-α* gene was associated with a higher frequency of MS exacerbations. Other polymorphisms did not demonstrate an association with both the risk of disease, the clinical features and response to treatment.

Keywords: multiple sclerosis, polymorphisms, genes, tumor necrosis factor

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКЗОГЕННЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА (HSP 27 И HSP 70) У ПАЦИЕНТОВ С ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. Г. М. Бодиенкова¹, *, Е. В. Боклаженко¹

¹ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», Ангарск, Россия

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 14.02.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Цель исследования заключалась в выявлении и сопоставлении изменений сывороточных концентраций белков теплового шока (HSP 27 и HSP 70) у пациентов с профессиональной патологией нервной системы, индуцированной воздействием физических и химических факторов. Обследованы пациенты с нейросенсорной тугоухостью (НСТ), хронической ртутной интоксикацией (ХРИ), вибрационной болезнью (ВБ), сформировавшейся как при воздействии локальной вибрации, так и комбинированном воздействии общей и локальной вибрации. В результате сравнительной оценки и анализа сывороточных концентраций белков теплового шока выявлены особенности в их изменении. У лиц с НСТ и ВБ, обусловленной воздействием локальной вибрации, зарегистрировано снижение сывороточной концентрации HSP 70, а у пациентов с ХРИ и ВБ, обусловленной комбинированным воздействием локальной и общей вибрации, зарегистрированы высокие концентрации HSP 27. Обследование пациентов в связной выборке через 3 г. свидетельствовало об отсутствии статистически значимых различий и сохранении изменений в содержании экзогенных HSP, что подтверждает прогрессивное течение указанных заболеваний. При этом установлена сопряженность количества субпопуляций Т-лимфоцитов и В-клеток с изменением сывороточных концентраций HSP, что подтверждает роль HSP 27 и 70 в регуляции иммунного ответа при ВБ и позволяет рассматривать их в качестве маркеров клеточных и тканевых повреждений при хроническом течении заболеваний.

Ключевые слова: белки теплового шока, закономерности изменений, нейросенсорная тугоухость, вибрационная болезнь, хроническая ртутная интоксикация

DOI: 10.31857/S1027813323030056, EDN: YUPSZF

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно, что белки теплового шока (HSP) принимают активное участие в реализации фундаментальных клеточных процессов. Синтез HSP в организме активируется при воздействии как внешних, так и внутренних факторов и является универсальной ответной реакцией организма на стресс [1]. При отсутствии воздействия стрессирующих факторов HSP также присутствуют в организме, защищая белковые молекулы и способствуя вновь образовавшимся белкам приобрести правильную структуру [2–4].

Белки теплового шока являются основными молекулярными маркерами практически любого экзогенного стресса [1]. В нашем случае определенный интерес представляет оценка изменений в содержании HSP 27 и HSP 70. HSP 27 содержит-

ся во многих тканях организма, является стресс-индуцируемым и играет важную роль в выживании клеток при действии стрессорных стимулов [5]. Он принимает активное участие в стабилизации структуры белков и ее сохранении [6]. HSP 27 активируется в поврежденных периферических нейронах взрослого человека и ингибирует цитотоксичность, хром С-опосредованный апоптоз, что является необходимым для защиты нейронов от различных повреждений [7]. Действуя как катализатор при повторном сворачивании денатурированных белков, HSP 27 играет значительную роль в выживании поврежденных нейронов. Белки теплового шока могут обладать иммуномодулирующими свойствами. При этом в процессы иммунорегуляции способен вовлекаться и циркулирующий внеклеточный пул, а клетки иммунной системы могут являться не только мишенями для этих белков, но и источником внеклеточных HSP [8, 9]. В ответ на такие стимулы как цитокины, факторы роста, гормоны и др. происходит

* Адресат для корреспонденции: 665827, Россия, Иркутская область, г. Ангарск, 12а м-н, д. 3, а/я 1170; e-mail: immun11@yandex.ru.

фосфорилирование HSP 27 [10]. HSP 70 это обширное семейство белков преимущественно отвечающих за защиту клеток и участвующих в презентации антигенов. Появление HSP 70 во внеклеточной среде может быть результатом совершенно разных процессов. Являясь многофункциональным, он может выходить как из гибнущих, так и из жизнеспособных клеток [4]. HSP 70 способен связывать разнообразные патологические белки с нарушенной структурой вследствие развития нейродегенеративных процессов и облегчать их рефолдинг [1]. Кроме того, HSP 70 принимает участие в иммунном ответе путем связывания антигенов, остатков разрушенных белковых молекул. В настоящее время имеются убедительные свидетельства о значимой роли нейроиммунных взаимоотношений в патогенезе многих профессиональных заболеваний нервной системы. Экспериментальные исследования показывают, что шапероны HSP вовлечены в развитие нейродегенерации и могут быть первой линией защиты при нарушении укладки белков [11–14]. Однако роль HSP в регуляции этих взаимоотношений по-прежнему остается недостаточно изученной. Исследование роли HSP в механизмах развития поражений нервной системы различного этиогенеза, выявление новых маркеров, могут улучшить надежность ранней дифференциальной диагностики и сыграть важную роль при разработке персонализированного подхода к лечению заболеваний нервной системы.

Цель исследования — выявить и сопоставить изменения сывороточных концентраций белков теплового шока у пациентов с нейросенсорной тугоухостью, хронической ртутной интоксикацией, вибрационной болезнью, сформировавшейся при воздействии локальной вибрации и комбинированном воздействии общей и локальной вибрации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено обследование мужчин с профессиональной патологией, проявляющейся преимущественным поражением нервной системы. В первую группу включены 55 пациентов с профессиональной нейросенсорной тугоухостью (НСТ), сформировавшейся при воздействии авиационного шума (пилоты инструкторы, командиры воздушного судна, бортмеханики) в возрасте 52.0 ± 1.36 г. Во вторую и третью, соответственно, — 25 мужчин с вибрационной болезнью (ВБ), обусловленной воздействием локальной вибрацией и 23 — комбинированным воздействием общей и локальной вибрации в возрасте 50.28 ± 0.68 г. Четвертую группу составили лица ($n = 17$) с установленным диагнозом хронической ртутной интоксикацией (ХРИ) средний возраст которых 53.4 ± 0.8 г., стаж — 15.6 ± 0.8 лет. Кроме того, в динамике через 3 г. в связной выборке проведено обследование 7 па-

циентов с ВБ от воздействия локальной, 18 — ВБ от комбинированного влияния и 17 — с ХРИ. Все пациенты находились на обследовании и лечении в клинике института. Клиническая верификация диагнозов осуществлялась врачами клиники в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Критериями включения в основные группы являлось наличие установленного во время работы в контакте с вредными производственными факторами диагноза и не имеющие на момент обследования клинических признаков острых или хронических заболеваний любой природы. В группу сравнения включены мужчины ($n = 27$) сопоставимые по возрасту (47.2 ± 4.7 г.) и общему трудовому стажу (14.2 ± 1.2 г.), не имеющие также клинических признаков острых или хронических заболеваний любой природы и контакта в условиях производства с физическими и химическими факторами.

Кровь для исследования у пациентов брали однократно при поступлении в стационар, натощак до проведения лечения, используя пробирки Vacutainer, которые центрифугировали при 1500 об./мин в течение 15 мин для получения сыворотки. Сыворотку отбирали в отдельные пробирки Эппендорф (Eppendorf). Концентрацию HSP70 и HSP27 в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием ELISA kits HSP70, HSP27 Assay Design (Enzo LifeScience, США) в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ “STATISTICA 6.0” (StatSoft, США). Возраст и стаж работы обследованных пациентов представлены в виде средней (M) и ее ошибки (m). Проверку нормальности распределения выполняли с использованием критерия Шапиро—Уилкса. Результаты представлены в виде медианы (Me), нижнего (Q_{25}) и верхнего (Q_{75}) квартилей. Для определения значимости между независимыми выборками при ненормальном распределении использовали критерий Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.085$. Кроме того, выполнен корреляционный анализ с помощью метода ранговой корреляции Спирмена (r) между концентрациями HSP и популяциями и субпопуляциями лимфоцитов, которые определены и представлены нами в предыдущем исследовании [15]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Обследование пациентов проходило в соответствии с этическим стандартом Хельсинской декларации всемирной ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека”, с поправками 2000 г. и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г., с информированного согласия па-

Таблица 1. Сравнительная оценка сывороточных концентраций HSP у пациентов с профессиональной патологией нервной системы, обусловленной воздействием физических и химических факторов, Ме (Q25–Q75)

Показатели, пг/мл	НСТ (<i>n</i> = 55) (1)	ВБ от воздействия локальной вибрации (<i>n</i> = 25) (2)	ВБ от комбинированного воздействия локальной и общей вибрации (<i>n</i> = 23) (3)	ХРИ (<i>n</i> = 17) (4)	Группа сравнения (<i>n</i> = 27)
HSP 27	2.75 (0.41–8.17) • 1–3 p = 0.0006	2.93 (0.41–6.83) • 2–3 p = 0.0004	3.76 (3.38–4.82)* • 3–4 p = 0.000000	2.05 (1.7–2.17)*	1.7 (0.57–3.61)
HSP 70	0.05 (0.04–0.12)* • 1–3 p = 0.000008; • 1–4 p = 0.0003	0.1 (0.04–0.36)* • 2–4 p = 0.001; • 2–3 p = 0.0003	0.39 (0.33–0.42)	0.41 (0.22–0.61)	0.37 (0.13–0.41)

Примечание: * различия при сопоставлении с группой сравнения статистически значимы при $p < 0.05$; • различия между группами статистически значимы при $p < 0.0085$.

циентов и по заключению местного этического комитета (протокол № 5 от 14.11.2012 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях нами показано, что профессиональные заболевания, индуцированные воздействием физических и химических факторов, имеют как общие закономерности, так и отличительные особенности изменений в иммунной системе [16]. При этом установлена сопряженность уровней цитокинов, АТ к регуляторным белкам нервной ткани и нейромедиаторам с нейрофизиологическими показателями, характеризующими состояние центральной и периферической нервной системы [17], а также с уровнем постоянного потенциала головного мозга [18]. Не исключено, что особенности функционального состояния организма при профессиональных заболеваниях нервной системы различного этиогенеза проявляются не только изменениями цитокинового профиля, фенотипического спектра лимфоцитов, АТ к белкам нервной ткани [19, 20], но и в содержании HSP. Тем более что рядом исследователей выявлены ассоциации между уровнями внеклеточных HSP с развитием атеросклероза, артериальной гипертензии, болезни Паркинсона, Альцгеймера и др. [21, 22].

В табл. 1 представлены результаты сравнительной оценки белков теплового шока у пациентов с профессиональной патологией нервной системы, сформировавшейся при воздействии физических и химических факторов. У пациентов с НСТ и ВБ, обусловленной воздействием локальной вибрации отмечается статистически значимое снижение концентрации HSP 70 относительно группы сравнения. У лиц с ВБ, сформировавшейся при комбинированном воздействии общей и локальной вибрации, значение указанного показателя

не изменялось при сопоставлении с группой сравнения и статистически значимо было выше относительно пациентов с НСТ ($p = 0.0006$) и ВБ, обусловленной воздействием локальной вибрации ($p = 0.004$). У пациентов с ХРИ напротив отмечается нарастание концентрации HSP 70 по сравнению с пациентами с НСТ ($p = 0.0003$) и ВБ от воздействия локальной вибрации ($p = 0.001$) и тенденция к увеличению относительно группы сравнения. Различные виды клеточного стресса могут способствовать как увеличению внутриклеточного содержания HSP, так и в ряде случаев индуцируют высвобождение их во внеклеточное пространство [22]. В нашем случае снижение в сыворотке крови HSP 70 может быть обусловлено накоплением его внутри клетки, выполняя на определенном этапе защитную функцию, если учесть ключевое значение HSP 70 в предотвращении образования неправильной конформации определенных нейрональных белков при нейродегенеративных процессах [7, 23]. В тоже время высокое содержание HSP 70 в клетке может служить маркером клеточных и тканевых повреждений [24]. Исследование внеклеточного содержания HSP 27 свидетельствовало о статистически значимом повышении его у пациентов с ХРИ при сопоставлении с группой сравнения и ВБ, обусловленной сочетанным воздействием локальной и общей вибрации, при сопоставлении с группой сравнения, а также с другими обследуемыми группами (ХРИ – $p = 0.0000$, НСТ – $p = 0.0006$ и ВБ от воздействия локальной вибрации $p = 0.0004$). Установленный факт, возможно, свидетельствует о прямом повреждении клеток, что способствовало высвобождению и выходу указанных белков во внеклеточное пространство [25]. При высвобождении HSP в кровь наблюдается повышенная экспрессия маркеров активации иммунной системы. Следовательно, можно предположить, что

Таблица 2. Изменения эндогенной HSP в динамике через 3 г. у пациентов с профессиональной патологией нервной системы, обусловленной воздействием физических и химических факторов, Ме (Q25–Q75)

Показатели, пг/мл	ВБ, обусловленная воздействием локальной вибрации		ВБ, обусловленная комбинированным воздействием вибрации		ХРИ	
	1 обследование (<i>n</i> = 7)	2 обследование (<i>n</i> = 7)	1 обследование (<i>n</i> = 18)	2 обследование (<i>n</i> = 18)	1 обследование (<i>n</i> = 17)	2 обследование (<i>n</i> = 17)
HSP 27	1.95 (1.61–2.15)	2.06 (1.97–2.26)	2.34 (1.39–2.72)	2.65 (2.0–3.83)	2.05 (1.7–2.17)	1.93 (1.57–2.05)
HSP 70	0.26 (0.08–0.47)	0.42 (0.26–0.46)	0.36 (0.13–0.56)	0.44 (0.39–0.71)	0.41 (0.22–0.61)	0.34 (0.15–0.76)

HSP способен запускать иммуновоспалительный процесс [26].

Анализируя взаимоотношения между концентрацией HSP с количеством популяций и субпопуляций лимфоцитов, определенных нами ранее и представленных в предыдущем исследовании [15] у тех же пациентов с ВБ установлено, что у лиц с ВБ, обусловленной как воздействием локальной вибрации, так и у лиц с ВБ, сформировавшейся при комбинированном воздействии локальной и общей вибрации, зарегистрированы положительные корреляции HSP 27 с абсолютным содержанием Т-лимфоцитов-хелперов CD4+ ($r = 0.59$, $p = 0.0017$; $r = 0.44$, $p = 0.035$ соответственно). У лиц с ВБ, сформировавшейся от воздействия локальной вибрации, выявлены также прямые зависимости между концентрацией HSP 27 и абсолютным количеством В-лимфоцитов ($r = 0.45$; $p = 0.025$), между содержанием HSP 70 и процентным содержанием В-лимфоцитов CD20+ ($r = 0.51$; $p = 0.009$). Установленные прямые зависимости между концентрациями HSP 27 и HSP 70 с В-лимфоцитами у пациентов с ВБ от воздействия локальной вибрации могут свидетельствовать и подтверждать их роль в развитии аутоиммунных реакций при ВБ. Указанный факт подтверждают и ранее выполненные исследования, свидетельствующие о нарастании выработки антител к регуляторным белкам нервной ткани (АТ к S-100, NF200, GFAP, В зав. Са-канал) [16]. Известно, что белки теплового шока оказывают непосредственное влияние на Toll-рецепторы клеток и способствуют выбросу биологически активных веществ, которые в свою очередь привлекают в данный очаг иммунокомпетентные клетки (лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, тучные клетки). В результате чего формируется воспалительный процесс, при котором причина активации Т- и В-лимфоцитов сохраняется даже после ликвидации очага воспаления в результате своевременного лечения [27]. Как известно, эпитопы HSP распознаются Т-клетками, что приводит к формированию регуляторных противовоспалительных фенотипов реактивных Т-клеток [2, 28]. В результате происходит “переключение” Th1-фенотипа на Th2 с

повышением уровня противовоспалительных IL-10 и IL-4 в Т-лимфоцитах [29].

Учитывая длительное течение профессиональных заболеваний, определенный интерес представляло оценить сывороточные концентрации белков теплового шока у пациентов с ВБ и с ХРИ в динамике через 3 г. (табл. 2).

Результаты обследования пациентов в связной выборке позволили установить, что выявленные изменения сывороточных концентраций HSP сохраняются и через 3 г. (табл. 2). Об этом свидетельствует отсутствие статистически значимых изменений медианных значений показателей HSP в динамике. При этом у лиц с ВБ, как от воздействия локальной вибрации, так и комбинированного воздействия общей и локальной вибрации обнаружена тенденция к нарастанию сывороточных концентраций HSP 27 и HSP 70, а у пациентов с ХРИ наблюдалась тенденция к снижению HSP70. Полученные результаты подтверждают прогрессивное течение патологического процесса при ВБ и ХРИ.

Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что наиболее значимые изменения сывороточных концентраций HSP обнаружены при ВБ, обусловленной комбинированным воздействием вибрации и у пациентов с ХРИ. Это подтверждается и ранее выполненными исследованиями, свидетельствующими о более выраженных нарушениях цитокинового баланса, аутоиммунных реакций в этих группах пациентов при сопоставлении с группой ВБ, обусловленной воздействием локальной вибрации, и НСТ [16]. При этом имеются единичные сообщения, свидетельствующие о том, что HSP могут приобретать антигенное начало и способствовать развитию клеточно-опосредованного и гуморального иммунного ответа, приводящего к повреждению сосудов мембраны эндотелия [30], которые являются наиболее уязвимыми при ВБ. Кроме того, белки теплового шока могут быть посредниками между сигналом опасности и контрольными механизмами аутоиммунитета [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате сравнительной оценки и анализа сывороточных концентраций белков теплового шока у пациентов с профессиональными заболеваниями нервной системы, обусловленных воздействием как физических, так и химических факторов выявлены особенности в их изменении. У лиц с НСТ и ВБ, обусловленной воздействием локальной вибрации, зарегистрировано снижение сывороточной концентрации HSP 70, а у пациентов с ХРИ и ВБ, обусловленной комбинированным воздействием локальной и общей вибрации, зарегистрированы высокие уровни HSP 27. Выявленные изменения в содержании HSP сохраняются продолжительное время, что подтверждает прогрессивное течение указанных заболеваний. При этом установлена сопряженность количества субпопуляций Т-лимфоцитов и В-клеток с уровнем сывороточных концентраций HSP. Совокупность полученных результатов и данных литературы подтверждает роль HSP 27 и 70 в регуляции иммунного ответа при профессиональных заболеваниях нервной системы и позволяет расценивать их в качестве маркеров клеточных и тканевых повреждений при хроническом течении заболеваний. Исследования в данном направлении продолжаются.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет финансовых средств, выделенных в рамках Государственного задания ФГБНУ ВСИМЭИ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Обследование пациентов соответствовало этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000) и “Правилами клинической практики в РФ”, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.

Информированное согласие. Исследования выполнены с информированного согласия пациентов на участие в них и одобрено Этическим комитетом ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (Протокол № 5 от 14.11.2012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимович Н.Е., Бонь Е.И. // Биомедицина. 2020. Т. 16. № 2. С. 60–67.
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-2-60-67>
2. Lancaster G.I., Febbraio M.A. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 24. P. 23349–23355.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M502017200>

3. Lelj-Garolla B., Mauk A.G. // J. Mol. Biol. 2005. V. 345. № 3. P. 631–642.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.056>
4. Bernardo B.C., Weeks K.L., Patterson N.L., McMullen J.R. // Future Med. Chem. 2016. V. 8. № 18. P. 2177–2183.
<https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0192>
5. Taylor R.P., Benjamin I.J. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2005. V. 38. № 3. P. 433–444.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.12.014>
6. Бозаитюк М.В., Кайгородова Е.В., Завьялова М.В. // Сибирский онкологический журнал. 2014. Приложение 1. 23с.
7. Белан Д.В., Екимова И.В. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 12. С. 1465–1485.
<https://doi.org/10.1134/S08698139191200219>
8. Кочеткова О.Ю., Юринская М.М., Евгеньев М.Б., Зацепина О.Г., Шабарчина Л.И., Сусликов А.В., Тихоненко С.А., Винокуров М.Г. // Доклады академии наук. 2015. Т. 465. № 4. С. 506–509.
<https://doi.org/10.7868/S0869565215340277>
9. Кабалык М.А., Гельцер Б.И., Осипов А.Л., Фадеев М.Ф. // Казанский медицинский журнал. 2016. Т. 97. № 5. С. 744–749.
<https://doi.org/10.17750/KMJ2016-744>
10. Lelj-Garolla B., Mauk A.G. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 12. P. 8169–8174.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M512553200>
11. Gao X., Carroni M., Nussbaum-Krammer C., Mogk A., Nilligoda N.B., Szlachet A., Guilbride D.L., Saibil H.R., Mayer M.P., Bukau B. // Mol. Cell. 2015. V. 59. № 5. P. 781–793.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.012>
12. Ganguly U., Chakrabarti S.S., Kaur U., Mukherjee A., Chakrabarti S. // Curr. Neuropharmacol. 2018. V. 16. № 7. P. 1086–1097.
<https://doi.org/10.2174/1570159X15666171129100944>
13. Ebrahimi-Fakhari D., Wahlster L., McLean P.J. // J. Parkinsons Dis. 2011. V. 1. № 4. P. 299–320.
14. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Чеснокова А.Ю. // Нейродегенеративные заболевания — от генома до целостного организма: Часть I: Моторная функция и ее регуляция в норме и при патологии. М.: Научный мир, 2014. С. 316–355.
15. Курчевенко С.И., Bodienkova G.M., Lakhman O.L. // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 13(22). № 2. С. 846–848.
<https://doi.org/10.31857/S102872210006677-9>
16. Бодиевкова Г.М., Боклаженко Е.В. // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 4. С. 385–390.
<https://doi.org/10.31857/S1027813321040026>
17. Боклаженко Е.В., Бодиевкова Г.М., Русанова Д.В. // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21. № 6. С. 1197–1202.
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-6-1197-1202>
18. Bodienkova G.M., Lakhman O.L., Boklazhenko E.V., Shevchenko O.I. // Neurochemical Journal. 2022. V. 16. № 3. P. 343–348.
<https://doi.org/10.1134/S1819712422330017>
19. Бодиевкова Г.М., Боклаженко Е.В. // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 1. С. 83–87.
<https://doi.org/10.31857/S1027813321010039>

20. Боклаженко Е.В., Бодиенкова Г.М. // Анализ риска здоровью. 2022. № 1. С. 140–145.
<https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.1.15>
21. Ганковская Л.В., Понасенко О.А., Свитич О.А. // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21. № 2. С. 201–208.
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-2-201-208>
22. Sapozhnikov A.M., Gusarova G.V., Ponomarev E.D., Telford W.G. // Cell Proliferation. 2002. V. 35. № 4. P. 193–206.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2002.00239.x>
23. Bianchi A., Moulin D., Huppon S., Koufany M., Netter P., Reboul P., Jouzeau J.-Y. // Free Radic. Biol. Med. 2014. V. 76. P. 114–126.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.028>
24. Андреева Л.И. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2002. Т. 1. № 2. С. 2–14.
25. Toomey C.B., Kelly U., Saban D.R., Rickman C.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 23. P. E3040–3049.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1424391112>
26. Mian M.O.R., Paradis P., Schiffrin E.L. // Curr. Hypertens. Rep. 2014. V. 16. № 2. P. 413.
<https://doi.org/10.1007/s11906-013-0413-9>
27. Yasuyuki A., Takayoshi J., Tomohiko O. // Infection and Immunity. 2003. V. 71. № 2. P. 717–725.
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.717-725.2003>
28. Buraczynska M., Ksiazek P., Kubit P., Zaluska W. // Cytokine. 2006. V. 36. № 3–4. P. 167–172.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.11.011>
29. Paul A.G., van Kooten P.J., van Eden W., van der Zee R. // J. Immunol. 2000. Vol. 165. № 12. P. 7270–7277.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7270>
30. Xu Q. // Curr Opin Cardiol. 2003. V. 18. № 4. P. 245–252.
<https://doi.org/10.1097/00001573-200307000-00001>
31. Prohaszka Z., Fust G. // Mol. Immunol. 2004. V. 41. № 1. P. 29–44.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.02.001>

Features of Changes in Exogenous Heat Shock Proteins (HSP 27 and HSP 70) in Patients with Occupational Nervous System Pathology

G. M. Bodienkova^a and E. V. Boklazhenko^a

^a Federal State Budgetary Scientific Institution “East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research”, Angarsk, Russia

The aim of the study was to identify and compare changes in serum concentrations of heat shock proteins (HSP 27 and HSP 70) in patients with occupational nervous system pathology induced by exposure to physical and chemical factors. Patients with sensorineural hearing loss (SHL), chronic mercury intoxication (CMI), vibration disease (VD) formed both under the influence of local vibration and combined exposure to general and local vibration were examined. As a result of comparative evaluation and analysis of serum concentrations of heat shock proteins, peculiarities in their change were revealed. In individuals with SHL and VD due to local vibration exposure, a decrease in serum HSP 70 concentration was recorded, and in patients with CMI and VD due to combined local and general vibration exposure, high HSP 27 concentrations were recorded. The examination of patients in the linked sample at 3 years showed the absence of statistically significant differences and the preservation of changes in the content of exogenous HSPs, which confirms the progressive course of these diseases. The conjugation of the number of T-lymphocyte and B-cells subpopulations with the change in serum HSP concentrations was established, which confirms the role of HSP 27 and 70 in the regulation of the immune response in VD and allows them to be regarded as markers of cellular and tissue damage in the chronic course of diseases.

Keywords: heat shock proteins, patterns of changes, sensorineural hearing loss, vibration disease, chronic mercury intoxication