
СОДЕРЖАНИЕ

Том 38, номер 1, 2021

Экспериментальные работы

- Влияние гимантана на изменения Ca^{2+} и Na^{+} , вызванные активацией NMDA-каналов в культивируемых нейронах мозга крысы
Н. А. Воронина, О. Ю. Лисина, И. А. Красильникова, В. Г. Кучеряну, И. Г. Капица, Т. А. Воронина, А. М. Сурин 3
- Альфа-синуклеин в крови у мышей на нейротоксической модели болезни Паркинсона
В. Е. Блохин, М. В. Угрюмов 14
- Модуляция показателей окислительного стресса и тиол-дисульфидного баланса в структурах мозга производными пантотеновой кислоты в экспериментальной модели болезни Паркинсона
Д. С. Семенович, Е. П. Лукиенко, Н. П. Канунникова 21
- Фармакокоррекция нарушений тиол-дисульфидного равновесия в головном мозге крыс интраназальной формой антагониста IL-1b при моделировании хронической церебральной ишемии
И. Ф. Беленичев, Б. С. Бурлака, Н. В. Бухтиярова, Е. Г. Алиева, Э. В. Супрун, А. М. Ищенко, А. С. Симбирцев 29
- Влияние белков теплового шока на продолжительность жизни и поведенческие функции животных с FUS-протеинопатией
Е. А. Вихарева, М. М. Чичёва, М. Б. Евгеньев, С. Ю. Фуников, А. В. Дейкин, С. О. Бачурин, А. А. Устюгов 37
- Серотониновые 5-HT_{1A} , 5-HT_{2A} и 5-HT_7 рецепторы в мозге мышей линии BTBR-модели аутизма
А. Я. Родный, Е. А. Куликова, Е. М. Кондаурова, В. С. Науменко 43
- Динамика формирования нарушений моноаминергических систем мозга потомства мышей линии BALB/c при введении вальпроата натрия беременным самкам: нейрохимическое изучение
В. С. Кудрин, В. Б. Наркевич, А. А. Алымов, И. Г. Капица, К. А. Касабов, Н. В. Кудряшов, В. Г. Коньков, Т. А. Воронина 52
- Изучение нейрохимических эффектов афобазола на содержание моноаминов и их метаболитов в условиях дефицита серотонина в структурах мозга мышей с различным эмоциональным фенотипом
В. Б. Наркевич, С. А. Литвинова, В. С. Роговский, И. Б. Цорин, В. С. Кудрин 59
- Нейрогенез в гиппокампе, дофаминергические нейроны черной субстанции и поведение стареющих мышей в условиях интраназального введения нативного белка α -синуклеина
В. В. Шерстнев, О. А. Соловьева, М. А. Грудень, А. М. Ратмиров, Е. В. Коновалова 67
-

Клиническая нейрохимия

- Периферические маркеры повреждения нервной ткани при аддиктивных и аффективных расстройствах
Л. А. Левчук, О. В. Рощина, Г. Г. Симуткин, Н. А. Бохан, С. А. Иванова 77
- Иммунохимические маркеры нейросенсорной тугоухости
Г. М. Бодиенкова, Е. В. Боклаженко 83
- Биохимические маркеры нарушений обмена фолатов при шизофрении в российской выборке
И. В. Семенов, А. С. Пятойкина, Я. С. Загряжская, Г. В. Рукавишников, Е. Д. Касьянов, Т. В. Жилева, А. С. Благодрава, Г. Э. Мазо 88
-

Contents

Vol. 38, no. 1, 2021

Experimental Articles

- Influence of Hemantane on Changes in Ca^{2+} and Na^{+} , Caused by Activation of NMDA Channels in Cultivated Rat Brain Neurons
N. A. Voronina, O. Yu. Lisina, I. A. Krasilnikova, V. G. Kucheryanu, I. G. Kapitsa, T. A. Voronina, and A. M. Surin 3
- Alpha-Synuclein in Blood of Mice with Neurotoxic Model of Parkinson's Disease
V. E. Blokhin and M. V. Ugryumov 14
- Modulation of Oxidative Stress and Thiol-Disulfide Balance Parameters in the Brain Structures by Pantothenic Acid Derivatives in Parkinson's Disease Experimental Model
D. S. Semenovich, E. P. Lukiynenko, and N. P. Kanunnikova 21
- Pharmacocorrection of Thiol-Disulfide Balance in the Brain of Rats by the Intranasal Form of the IL-1b Antagonist in a Model of Chronic Cerebral Ischemia
I. F. Belenichev, B. S. Burlaka, N. V. Bukhtiyarova, E. G. Aliyeva, E. V. Suprun, A. M. Ishchenko, and A. S. Simbirtsev 29
- The Role of Heat Shock Proteins on Life Duration and Behavioral Functions of Mice with FUS-Proteinopathy
E. A. Vikhareva, M. M. Chicheva, M. B. Evgen'ev, S. Yu. Funikov, A. V. Deikin, S. O. Bachurin, and A. A. Ustyugov 37
- Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₇ Receptors in the Brain of Mice of BTBR Strain – The Model of Autism
A. Ya. Rodnyy, E. A. Kulikova, E. M. Kondaurova, and V. S. Naumenko 43
- The Neurochemical Study of the Dynamics of Disturbances of Brain Monoaminergic Systems Induced by Valproic Acid at the Different Stages of Ontogeny of BALB/c Mice
V. S. Kudrin, V. B. Narkevich, A. A. Alymov, I. G. Kapitsa, K. A. Kasabov, N. V. Kudryashov, V. G. Konkov, and T. A. Voronina 52
- Study of the Neurochemical Effects of Afobazole on the Content of Monoamines and its Metabolites in the Model of Serotonin Deficiency in the Brain Structures of Mice with Different Emotional Phenotypes
V. B. Narkevich, S. A. Litvinova, V. S. Rogovsky, I. B. Tsorin, and V. S. Kudrin 59
- Neurogenesis in the Hippocampus, Dopaminergic Neurons of the Substantia Nigra, and the Behavior of Aging Mice after Intranasal Administration of Native α -Synuclein Protein
V. V. Sherstnev, O. A. Solovieva, M. A. Gruden, A. M. Ratmirov, and E. V. Konovalova 67

Clinical Neurochemistry

- Peripheral Markers of Damage of Nervous Tissue in Addictive and Affective Disorders
L. A. Levchuk, O. V. Roshchina, G. G. Simutkin, N. A. Bokhan, and S. A. Ivanova 77
- Immunochemical Markers of Sensorineural Hearing Loss
G. M. Bodienkova and E. V. Boklazhenko 83
- Biochemical Markers of Folate Metabolism Disturbances in Schizophrenia in Russian Population
I. V. Semennov, A. S. Pyatoykina, Ya. S. Zagryazhskaya, G. V. Rukavishnikov, E. D. Kasyanov, T. V. Zhilyaeva, A. S. Blagonravova, and G. E. Mazo 88

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.25

ВЛИЯНИЕ ГИМАНТАНА НА ИЗМЕНЕНИЯ Ca^{2+} И Na^+ , ВЫЗВАННЫЕ АКТИВАЦИЕЙ NMDA-КАНАЛОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ МОЗГА КРЫСЫ

© 2021 г. Н. А. Воронина^{1, *}, О. Ю. Лисина^{1, *}, И. А. Красильникова²,
В. Г. Кучеряну¹, И. Г. Капица³, Т. А. Воронина³, А. М. Сурин^{1, 2, **}

¹ФГБНУ “НИИ общей патологии и патофизиологии”, Москва, Россия

²ФГАУ “НМИЦ Здоровья детей” Минздрава России, Москва, Россия

³ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.12.2020 г.

После доработки 23.12.2020 г.

Принята к публикации 24.12.2020 г.

При болезни Паркинсона одним из ведущих механизмов нейродегенерации является эксайтотоксичность глутамата, основного возбуждающего нейромедиатора мозга, развивающаяся в результате избыточной стимуляции ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-типа. Препараты, способные обратимо ингибировать NMDA рецепторы, рассматривают в качестве перспективных фармакологических агентов, предотвращающих гибель нейронов и замедляющих развитие нейродегенерации. В данной работе исследовано влияние N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорида (гимантана, Hmnp) на изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$), индуцированные NMDA в первичных нейроглиальных культурах, приготовленных из коры головного мозга 1-2-дневных крыс Вистар. Измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^+]_i$ и $\Delta\Psi_m$ выполнены в индивидуальных нейронах методом флуоресцентной микроскопии с применением индикаторов Ca^{2+} и Na^+ , соответственно Fura-FF и SBFI, и потенциал-чувствительного зонда Rh123. Кратковременные добавки NMDA (2–3 мин, 10 мкМ) вызвали быстрые транзиторные подъемы $[\text{Ca}^{2+}]_i$, которые в ~30% нейронов были частично и обратимо ингибированы высокими концентрациями Mg^{2+} (10 мМ) и Hmnp (100 мкМ). Длительное действие нейротоксической концентрации NMDA (16 мин, 500 мкМ) вызвало развитие отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД), устойчивый подъем $[\text{Na}^+]_i$ и сильное падение $\Delta\Psi_m$. Гимантан снижал рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отдаллял развитие ОКД, уменьшал деполяризацию митохондрий и способствовал восстановлению исходных значений $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^+]_i$ и $\Delta\Psi_m$ после прекращения действия NMDA. В отличие от Hmnp, высокоаффинный неконкурентный ингибитор NMDA-каналов МК-801 необратимо ингибировал изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$. Очевидно, Hmnp проявляет нейропротекторные свойства, благодаря снижению потоков Ca^{2+} и Na^+ сквозь NMDA-каналы и меньшему росту $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^+]_i$. Обратимость ингибирования NMDA-каналов может благоприятствовать нормализации функционирования мозга после отмены гимантана.

Ключевые слова: глутамат, рецепторы, гимантан, кальций, натрий, митохондриальный потенциал

DOI: 10.31857/S1027813321010167

ВВЕДЕНИЕ

При болезни Паркинсона (БП) нарушается система отрицательной обратной связи межнейронных контактов. В результате этого возбужденные нейроны не получают или не воспринимают быстрого и сбалансированного ингибирующего сигнала от других нейронов. В структуре мозга, называемой “черной субстанцией” (substantia nigra

pars compacta), которая в значительной степени контролирует моторно-двигательную сигнализацию, отрицательную обратную связь осуществляют дофаминэргические нейроны. Их постепенная гибель по мере старения организма является причиной недостаточной компенсации возбуждающей сигнализации [1, 2].

В центральной нервной системе основным возбуждающим нейромедиатором является глутаминовая кислота, которая при физиологических pH существует в форме цвиттериона, глутамата (Glu). Возбуждение нейронов возникает после связывания Glu с несколькими типами ионотропных ре-

* Эти авторы внесли равный вклад в исследование.

**Адресат для корреспонденции: 119991 Россия, Москва, Ломоносовский пр-кт, д.2, стр.1; тел.: (499)134-1445; e-mail: surin_am@mail.ru

цепторов, в структуру которых входит канал для ионов Ca^{2+} , Na^{+} и K^{+} [3, 4]. Для указанных катионов максимальной проводимостью и минимальной скоростью инактивации обладают рецепторы NMDA-типа. Избыточная стимуляция этих рецепторов глутаматом, так называемая глутаматная нейротоксичность или эксайтотоксичность, приводит к гибели нейронов [5–9]. В этой связи одним из направлений разработки лекарств против БП является поиск ингибиторов NMDA-рецепторов [10–15].

Препараты, которые конкурируют с глутаматом или глицином в сайтах их связывания на NMDA-рецепторе, блокируют нормальную функцию и, таким образом, до сих пор не прошли клинических испытаний из-за побочных эффектов (сонливость, галлюцинации и даже кома) [16]. Аллостерический ингибитор NMDA-рецепторов МК-801 (дизоцильпин), который часто используют в экспериментах на клеточных культурах или с животными, прочно связывается с внеканальной частью рецептора и почти необратимо тормозит межнейрональную сигнализацию в мозге в течение клинически неприемлемого времени. Поэтому актуальным остается поиск и создание новых фармакологических препаратов, которые эффективно и селективно блокируют NMDA-рецепторы, но при этом достаточно быстро выводятся из организма.

В настоящее время для снижения симптоматики БП применяют только один ингибитор NMDA-рецепторов, мемантин, который является аминопроизводным адамантана. Способность блокировать NMDA-каналы для неорганических катионов подробно изучена методами электрофизиологии для производных адамантана [17, 18]. Однако внутриклеточные концентрации этих катионов, прежде всего Ca^{2+} и Na^{+} , определяются не только скоростью их поступления из окружающей клетки среды в цитозоль по NMDA и другим каналам, но и скоростью удаления этих катионов из цитозоля соответствующими ионными насосами и обменниками, локализованными как на плазматической, так и на внутриклеточных мембранах. Помимо этого, остается открытым вопрос о динамике восстановления нормальной концентрации ионов Ca^{2+} и Na^{+} после удаления Glu и ингибитора NMDA-каналов.

Ранее на экспериментальном паркинсонизме мышей, вызванном системным введением про-нейротоксина МФТП показано, что аналог мемантина гимантан (Hmnp) при предварительном применении уменьшал паркинсоническую симптоматику (гипокинезию и мышечную ригидность животных [19]), снижал уровень продуктов перекисного окисления липидов в мозге мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом [20].

В данной работе сопоставлено влияние гимантана (N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорида, Hmnp) с влиянием МК-801 и Mg^{2+} на изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), Na^{+} ($[\text{Na}^{+}]_i$) и митохондриального потенциала $\Delta\Psi_m$, индуцированные NMDA в культивируемых нейронах. Показано, что Hmnp снижает индуцированный NMDA рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и уменьшает деполяризацию митохондрий в нейронах первичной культуры из коры головного мозга крысы в меньшей степени и более обратимо, чем МК-801, и с различной эффективностью в разных клетках. Hmnp меньше влияет на $[\text{Na}^{+}]_i$, чем на $[\text{Ca}^{2+}]_i$, что может благоприятствовать нормализации функционирования мозга после отмены гимантана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные нейрональные культуры приготавливали из коры головного мозга 1-дневных крыс породы Вистар, как описано ранее [21]. Кратко, животное анестезировали, декапитировали и извлекали кору головного мозга. Суспензию клеток получали, обрабатывая ткань коры папаином, диссоциировали пипетированием и отмывали от разрушенных клеток двукратным осаждением в центрифуге. Полученную суспензию клеток в нейробазальной среде с добавлением 2% Supplement B-27 и 0.5 mM L-глутамин наносили на покровные стекла, прикрепленные к лункам 35 мм пластиковых чашек Петри (“MatTek”, США). Стекла предварительно покрывали полиэтиленмином (1 мг/мл, 30 мин); плотность посадки 2.5×10^5 клеток/лунку. Клетки росли при 37°C в атмосфере 5% CO_2 /95% воздуха при 100% влажности.

Клеточные культуры использовали спустя 12–15 дней после посадки (12–15 дней в культуре, ДВК). Клетки нагружали низкоаффинными Ca^{2+} -индикаторами Fura-FF или X-rhod-FF и Na^{+} индикатором SBFI в форме ацетоксиметил-эфиров (соответственно Fura-FF/AM, 4–6 μM , X-rhod-FF/AM, 1 μM и SBFI/AM, 6–8 μM) при 36°C в течение 50–60 мин. Изменения величины митохондриального потенциала $\Delta\Psi_m$ выполнены с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда родамина-123 (Rh123; клетки нагружали 15 мин, 2,5 μM , 36°C).

Измерения проводили в буферных растворах состава (mM): 134 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 20 HEPES, 5 glucose; pH = 7.4 при температуре 27–29°C. В тех случаях, когда NMDA-каналы ингибировали, повышая концентрацию Mg^{2+} , его концентрацию в буфере увеличивали до 10 mM; остальные компоненты сохраняли в той же концентрации. В экспериментах с применением длительных воздействий высоких концентраций NMDA (500 μM , 16 мин), удаление агониста проводили

номинально бескальциевым буфером, в котором 2 мМ CaCl_2 замещали на 0.1 мМ Ca^{2+} -хелатора ЭГТА (этиленгликоль-бис(β -аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота). Калибровку максимальных сигналов Ca^{2+} -индикаторов осуществляли в конце каждого эксперимента, добавляя 2 μM Ca^{2+} -ионофора иономицина в присутствии 5 мМ CaCl_2 .

Наступление отсроченной кальциевой дисрегуляции (лаг-период ОКД) определяли, как время второго максимум на графике первой производной сигнала X-rhod-FF (график зависимости $\Delta F/\Delta T$ от T, где F – интенсивность флуоресценции индикатора; T – время от момента добавки NMDA; Δ – шаг дифференцирования, 10с).

Флуоресцентные измерения выполнены с помощью системы получения и анализа изображений на базе инвертированного микроскопа Olympus IX-71 (Япония), включающей 175 Вт лампу, систему освещения с фильтровыми колесами каналов возбуждения и эмиссии Sutter Lambda 10-2 (США), перемещение которых синхронизовано с регистрацией изображений охлаждаемой CCD-камерой CoolSnap HQ-2 (Photometrics, США). Управление системой, сохранение изображений и последующий их анализ осуществляли с помощью программ MetaFluor и MetaFluor Analyst (Molecular Devices, USA).

Гимантан (рис. 1) (N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорид) синтезирован в ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” из адамантан-2-она и гексаметиленмина в условиях реакции Лейкарта и представляет собой белое кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде [15, 22, 23].

Флуоресцентные индикаторы Ca^{2+} , Na^{+} и Rh123 приобретены у Molecular Probes (Thermo Fisher, USA). Остальные реагенты Sigma (USA).

Статистический анализ данных, построение графиков, вычисление площадей под кривыми выполняли, используя программы GraphPad Prism 8 и Microsoft Excel 2010. Результаты статистической обработки представлены как среднее $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего). Количество клеток было от 40 до 60, если не отмечено особо. Статистически отличия между сравниваемыми группами данных считали достоверными, если $p < 0.05$ (two-tailed *t*-test).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) вызванные одним NMDA и в присутствии ингибиторов NMDA-рецепторов. Ранее электрофизиологические измерения на свежееизолированных нейронах гиппокампа крысы показали, что высокая концентрация гимантана (Hmn, 100 мкМ)

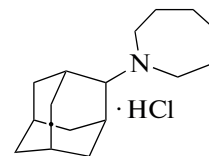


Рис. 1. Структурная формула N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорида (гимантана).

ингибирует >90% ионного тока через NMDA-рецепторы, причем Hmn, как и Mg^{2+} , располагается внутри канала [17, 18]. Поэтому мы проверили, 1) будут ли 100 мкМ Hmn столь же эффективно ингибировать рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в первичной культуре нейронов коры головного мозга крысы и 2) будет ли эффективность ингибирования гимантаном и ионами магния одинаковой в одних и тех же клетках. Измерения с помощью низкоаффинного Ca^{2+} -индикатора Fura-FF, показали, что ~75% клеток (29 из 39 в поле наблюдения) отреагировали на кратковременное добавление NMDA (10 μM , 2 мин) быстрым подъемом $[\text{Ca}^{2+}]_i$, причем амплитуда роста была индивидуальной для каждой клетки (рис. 2а). Остальные клетки, не изменившие $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на NMDA, очевидно, не содержали NMDA-рецепторов и относились к глии либо к нейронам, лишенным этих ионотропных рецепторов. Эти клетки исключены из рассмотрения при анализе данных на рис. 2г и 2в.

Примерно 14% клеток, которые отреагировали на первую аппликацию NMDA, не смогли восстановить исходное значение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после отмывания агониста буфером (рис. 2а, б). В них развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД) [7]. Последующее чередование добавления и отмывания NMDA последовательно увеличивало долю клеток, в которых развилась ОКД (рис. 2а, б), несмотря на присутствие Hmn и Mg^{2+} . По-видимому, в этих нейронах в период между добавками не успевала восстановиться $[\text{Na}^{+}]_i$ и, соответственно, потенциал плазматической мембраны [24]. Подобный кумулятивный эффект наблюдали при повторных кратковременных добавках глутамата к культивируемым гиппокампальным нейронам [25].

Увеличение концентрации Mg^{2+} в буфере до 10 мМ уменьшило скачок $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызванный повторной добавкой NMDA, но не во всех клетках и в разной степени (рис. 2а). Доля клеток, в которых развилась ОКД, увеличилась с ~14 до ~31% (рис. 2б). В этих нейронах $[\text{Ca}^{2+}]_i$ оставалась высокой на протяжении остальной части эксперимента независимо от наличия NMDA.

Поскольку Hmn входит, как отмечалось выше, только в предварительно открытый агонистом канал, то добавление этого ингибитора осуществляли

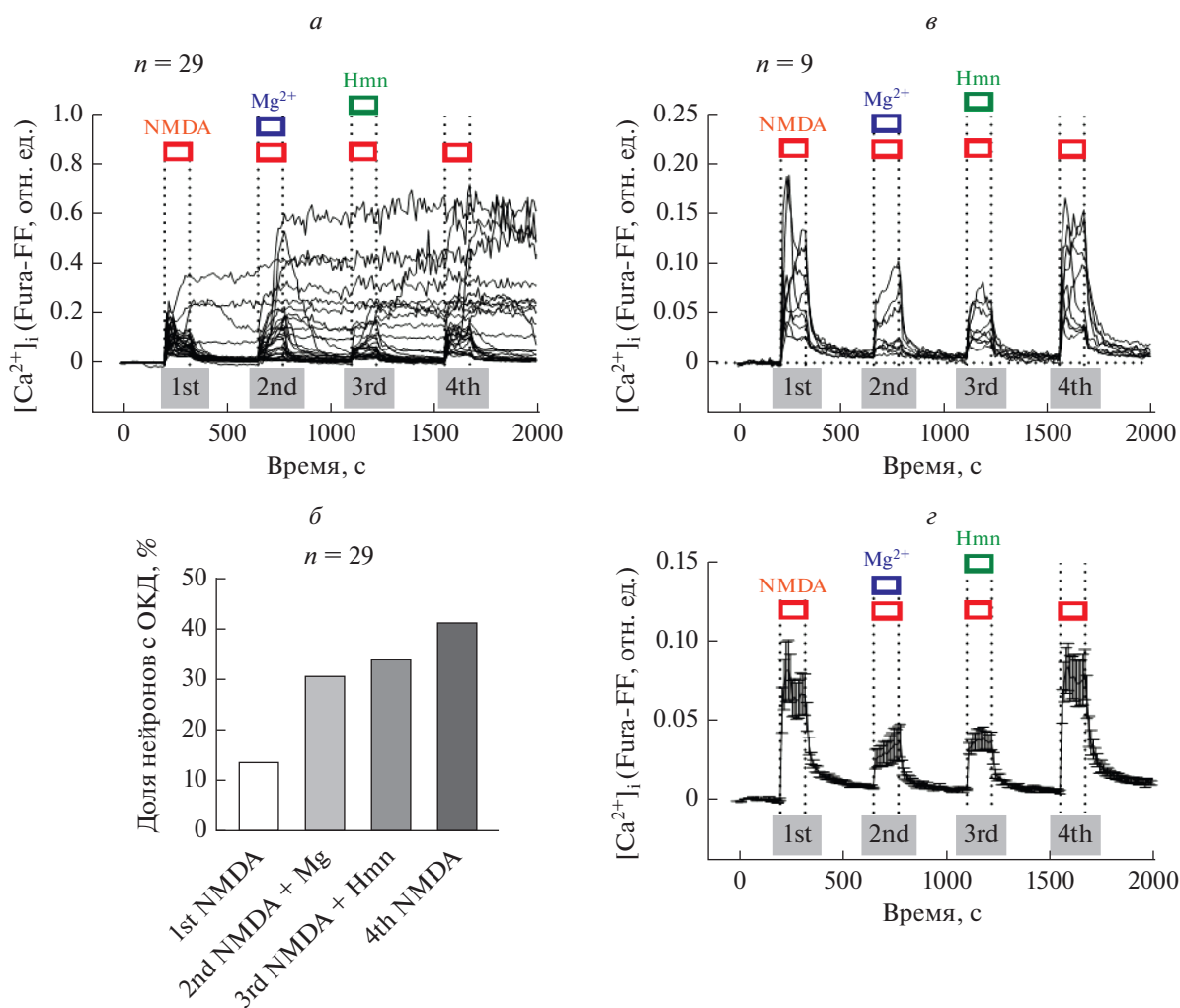


Рис. 2. Изменения внутриклеточной концентрации свободного кальция ($[Ca^{2+}]_i$), вызванные одним NMDA и в присутствии ингибиторов канала — Mg^{2+} и гимантана (Hmnp). *a–г* — изменения $[Ca^{2+}]_i$ представлены как отношения сигналов флуоресцентного низкоаффинного Ca^{2+} -индикатора Fura-FF, измеренных при возбуждении на 340 и 380 нм (F340/F380) и регистрации при 525 нм. Графики нормированы по оси ординат для каждого нейрона согласно уравнению: $(R - R_{min}) / (R_{max} - R_{min})$, где R — текущее значение F340/F380, R_{min} и R_{max} — соответственно минимальное наблюдаемое в начале эксперимента и максимальное в присутствии Ca^{2+} ионофора иономицина (2 мкМ + 5 мМ внеклеточного Ca^{2+}) в конце эксперимента. Концентрации агентов во время первой (1st) и четвертой (4th) добавок: 10 μ M NMDA, 10 μ M Gly, 0 Mg^{2+} , 2 mM Ca^{2+} ; во время второй (2nd) и третьей (3rd) добавок концентрации Mg^{2+} и Hmnp составляли соответственно 10 и 0.1 mM; концентрации остальных компонентов сохраняли такими же, как во время первой и четвертой добавок.

одновременно с добавлением NMDA. Гимантан (100 мкМ) снизил амплитуду $[Ca^{2+}]_i$ ответов на NMDA, однако, как и в случае с предшествующей добавкой 10 mM Mg^{2+} , ингибирование было отмечено только в части нейронов (рис. 2*a, б*). Доля нейронов, в которых $[Ca^{2+}]_i$ осталась на высоком уровне, несмотря на удаление NMDA и Hmnp, увеличилась до ~35% (рис. 2*б*).

Для проверки того, что влияние 10 mM Mg^{2+} и 100 мкМ Hmnp на изменения $[Ca^{2+}]_i$ связано с их ингибирующим действием, была сделана четвертая добавка NMDA в буфере того же состава, что

и первая добавка (рис. 2). Доля нейронов, в которых возникла ОКД, возросла до ~41% (рис. 2*б*).

Учитывая сложный характер $[Ca^{2+}]_i$ ответов клеток на действие как одного NMDA, так и в присутствии Mg^{2+} или Hmnp, мы рассмотрели динамику ответов на стимулы только в тех нейронах, в которых первая (1st) и последняя (4th) добавки NMDA вызвали примерно одинаковые по амплитуде и полностью обратимые изменения $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 2*в, г*). Профиль кривых $[Ca^{2+}]_i$ не был одинаковым во время каждой из четырех добавок даже в тех клетках, в которых были одинаковы

амплитуды подъемов $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Поэтому количественным показателем была выбрана суммарная $[\text{Ca}^{2+}]_i$ за время действия соответствующих агентов, т.е. площадь под кривой изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (area under curve, AUC).

График соотношения площади под кривой $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время первой (1st) и последней (4th) добавки NMDA был близок к линейной функции с наклоном 1.13 ± 0.17 (Mean $\pm$ SEM, $n = 9$) (рис. 3в). Чем больше была амплитуда подъема $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (и соответственно AUC) во время первой добавки NMDA, тем больше она была и при последнем четвертом воздействии агониста. Такое же соотношение наблюдалось и при действии NMDA в присутствии Hmnp, но наклон был в 2.5 раза меньше (0.453 ± 0.073 , $n = 9$), что отражает ингибирующее действие антагониста (рис. 3б). Неожиданным оказалось отсутствие корреляции между интегральным ответом $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на первую добавку NMDA и на вторую при его действии в присутствии 10 мМ Mg^{2+} (рис. 3а). Не выявлено также корреляции между действием NMDA в присутствии 10 мМ Mg^{2+} и 100 мкМ Hmnp (график не показан). При этом средние амплитуды изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2г) и средние величины AUC (рис. 3а, б) при действии NMDA в присутствии 10 мМ Mg^{2+} и 100 мкМ Hmnp практически одинаковые (в диапазоне 0.6–0.7).

Гимантан частично и обратимо ингибирует изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, индуцированные высокой концентрацией NMDA. Нейропротекторные свойства ингибиторов глутаматных каналов NMDA-типа особенно важны при высоких, нейротоксических концентрациях глутамата. Поэтому мы сравнили изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, применяя высокие концентрации NMDA в присутствии Hmnp. Для сравнения был использован аллостерический ингибитор NMDA-рецепторов МК-801, место связывания которого, в отличие от Hmnp, находится вне канала [17, 18].

Действие 500 мкМ NMDA вызывало быстрый, но относительно небольшой подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$, который после короткого лаг-периода переходил во вторую фазу подъема $[\text{Ca}^{2+}]_i$, названную отсроченной кальциевой дизрегуляцией (ОКД) (рис. 4а) [6, 7]. Синхронно с ОКД происходила вторая фаза падения $\Delta\Psi_m$, которая проявлялась в быстром и значительном увеличении флуоресценции Rh123 (рис. 4б, см. также рис. 4д, е) [26]. Отмывание NMDA приводило к медленному снижению $[\text{Ca}^{2+}]_i$, начало которого, как и наступление ОКД, было индивидуальным в каждой клетке. Снижение сигнала потенциал-чувствительного митохондриального зонда Rh123 в период отмывания NMDA (рис. 4б) обусловлено частично восстановлением потенциала (ростом $\Delta\Psi_m$), а частично

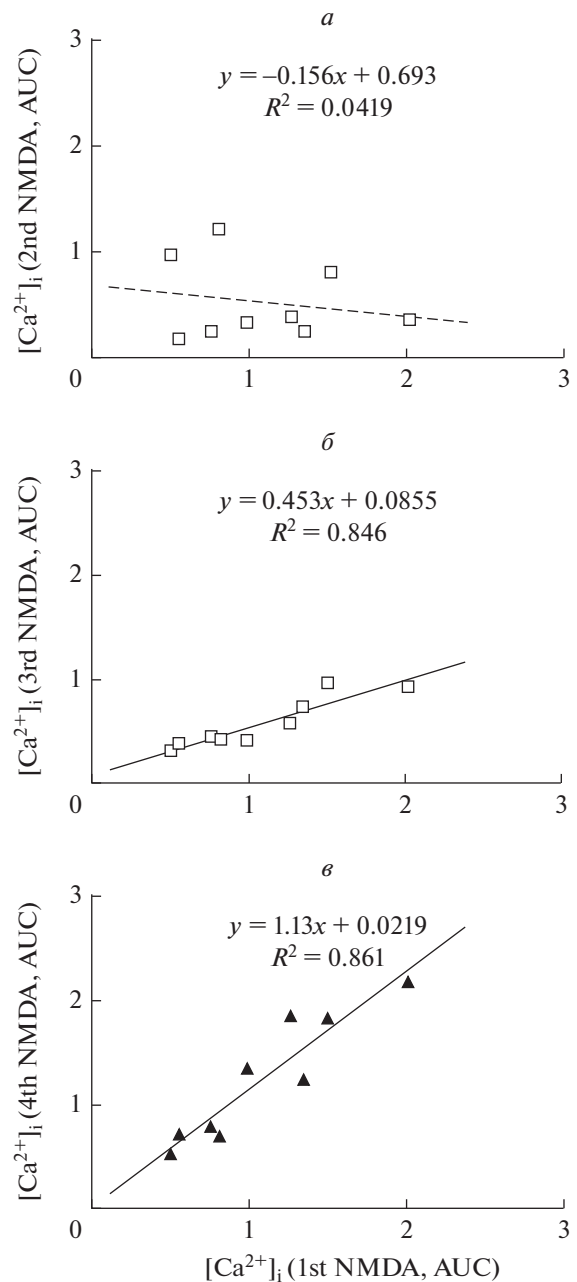


Рис. 3. Соотношение площадей под графиками изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызванных одним NMDA и NMDA в присутствии Mg^{2+} или Hmnp (см. рис. 2а, в, з). Площади под кривыми изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (AUC, отн. ед.) определяли в течение первых 150 с после добавки агентов. По осям абсцисс представлены значения параметра AUC после самой первой добавки NMDA (соответствует 1st на рис. 2а, в, з). По осям ординат представлены значения AUC после добавки NMDA в присутствии 10 мМ Mg^{2+} (а) (2nd на рис. 2) и NMDA в присутствии 0.1 мМ Hmnp (б) (3rd, на рис. 2). Последняя четвертая добавка NMDA (в) (4th, на рис. 2) сделана для проверки воспроизводимости изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

вытеканием зонда из клеток сквозь деполяризованную плазматическую мембрану [26].

Для оценки количества Ca^{2+} , которое митохондрии накопили во время действия NMDA и смогли удержать после отмывания агониста бескальциевым буфером, в конце эксперимента добавляли протонофор FCCP (1 мкМ). Протонофор вызывал полную деполяризацию митохондрий, ликвидируя электрофоретическую силу, удерживавшую Ca^{2+} в матриксе митохондрий.

Видно, что те клетки, которые в присутствии Hmnp имели небольшой подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$, смогли накопить и удержать относительно небольшое количество Ca^{2+} по сравнению с теми нейронами, в которых, несмотря на присутствие ингибитора, развилась ОКД (рис. 4а, в).

Две представительные клетки, в одной из которых произошла ОКД с последующим восстановлением низкой $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после отмывания NMDA, а во второй ОКД не успела возникнуть за время действия агониста, показаны, соответственно на рис. 4д и 4е. Нейрон, в котором развилась ОКД, смог удержать небольшое количество Rh123 в митохондриях (рис. 4д), тогда как нейрон, не имевший ОКД (рис. 4е), высвободил небольшое количество Ca^{2+} из митохондрий, но зато относительно много Rh123, поскольку митохондрии сохранили высокий $\Delta\Psi_m$ во время действия NMDA.

Гимантан частично ингибирует изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и внутриклеточной концентрации Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$), вызванные NMDA. NMDA каналы хорошо проницаемы для ионов натрия. Мы сопоставили изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^+]_i$, вызванные одной NMDA и в присутствии Hmnp. Ингибитор уменьшил долю нейронов, в которых произошла ОКД за время действия NMDA (рис. 5а, в, ж). Этот феномен проявился также в увеличении лаг-периода ОКД в присутствии Hmnp (рис. 5ж).

Увеличение $[\text{Na}^+]_i$ в ответ на NMDA происходило без лаг-периода и $[\text{Na}^+]_i$ оставалась на уровне высокого плато до конца действия агониста. Отмывание NMDA не привело к снижению $[\text{Na}^+]_i$ даже в тех нейронах, в которых снизилась $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 5б). Похожее соотношение изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^+]_i$ соответствует описанному ранее для культуры гиппокампальных [27] и кортикальных нейронов [24].

Присутствие Hmnp увеличило долю нейронов, в которых не произошло роста $[\text{Na}^+]_i$ (рис. 5з). Более того, появились нейроны, в которых удаление NMDA вызывало снижение $[\text{Na}^+]_i$ с уровня высокого плато до почти базального. Однако эти отличия имели характер тенденции и достоверно не отличались (рис. 5з).

ОБСУЖДЕНИЕ

При болезни Паркинсона, как и при ряде других нейродегенеративных заболеваний, одним из ведущих механизмов гибели нейронов является эксайтотоксичность основного возбуждающего нейромедиатора мозга глутамата [2, 13, 14]. Эксайтотоксичность развивается в результате избыточной стимуляции ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-типа. Препараты, способные обратимо ингибировать NMDA рецепторы, рассматривают в качестве перспективных фармакологических агентов, предотвращающих гибель нейронов и замедляющих развитие глутаматной эксайтотоксичности разной этиологии, включая нейродегенерацию. В данной работе методом флуоресцентной микроскопии измерены изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^+]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в первичной нейроглиальной культуре коры головного мозга и проведен анализ нейропротекторных возможностей Hmnp в условиях, соответствующих эксайтотоксическому действию Glu.

Способность Hmnp обратимо ингибировать NMDA-рецепторы была исследована ранее на свежеизолированных нейронах гиппокампа крысы методами электрофизиологии [17, 18]. Авторы обнаружили, что степень блокады увеличивалась с повышением концентрации Hmnp, тогда как деблокирование не зависело от концентрации и усиливалось при гиперполяризации клеточной мембраны. Примечательно, что Hmnp оставался “запертым” внутри канала “активационными воротами” и деблокирование канала происходило лишь при новом воздействии агониста на клетку и открывании “ворот”.

Данные, полученные нами с помощью кальциевого имиджинга индивидуальных нейронов, не во всем согласуются с результатами электрофизиологических экспериментов. Во-первых, Hmnp в концентрации 100 мкМ, при которой на 90% ингибировал ионные токи через канал, блокировал индуцированный NMDA рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ не во всех нейронах, а только в тех, в которых перед повторным добавлением NMDA $[\text{Ca}^{2+}]_i$ смогла вернуться к базальному уровню (рис. 2в). В тех нейронах, в которых $[\text{Ca}^{2+}]_i$ не вернулась к уровню в покоящихся нейронах перед повторной стимуляцией NMDA-рецепторов, Hmnp не влиял на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (третья добавка NMDA+Hmnp на рис. 2а). Неспособность ингибиторов снижать $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах, если в них уже возникла ОКД, наблюдали ранее на культурах гиппокампа крысы [25] и гранулярных нейронов мозжечка [28]. Объясняли этот феномен тем, что во время высокого $[\text{Ca}^{2+}]_i$ плато, которое наступает после завершения развития ОКД, скорости поступления Ca^{2+} в цитоплазму и удаления из нее становятся очень низкими и поэтому никакие ингибиторы NMDA-каналов не

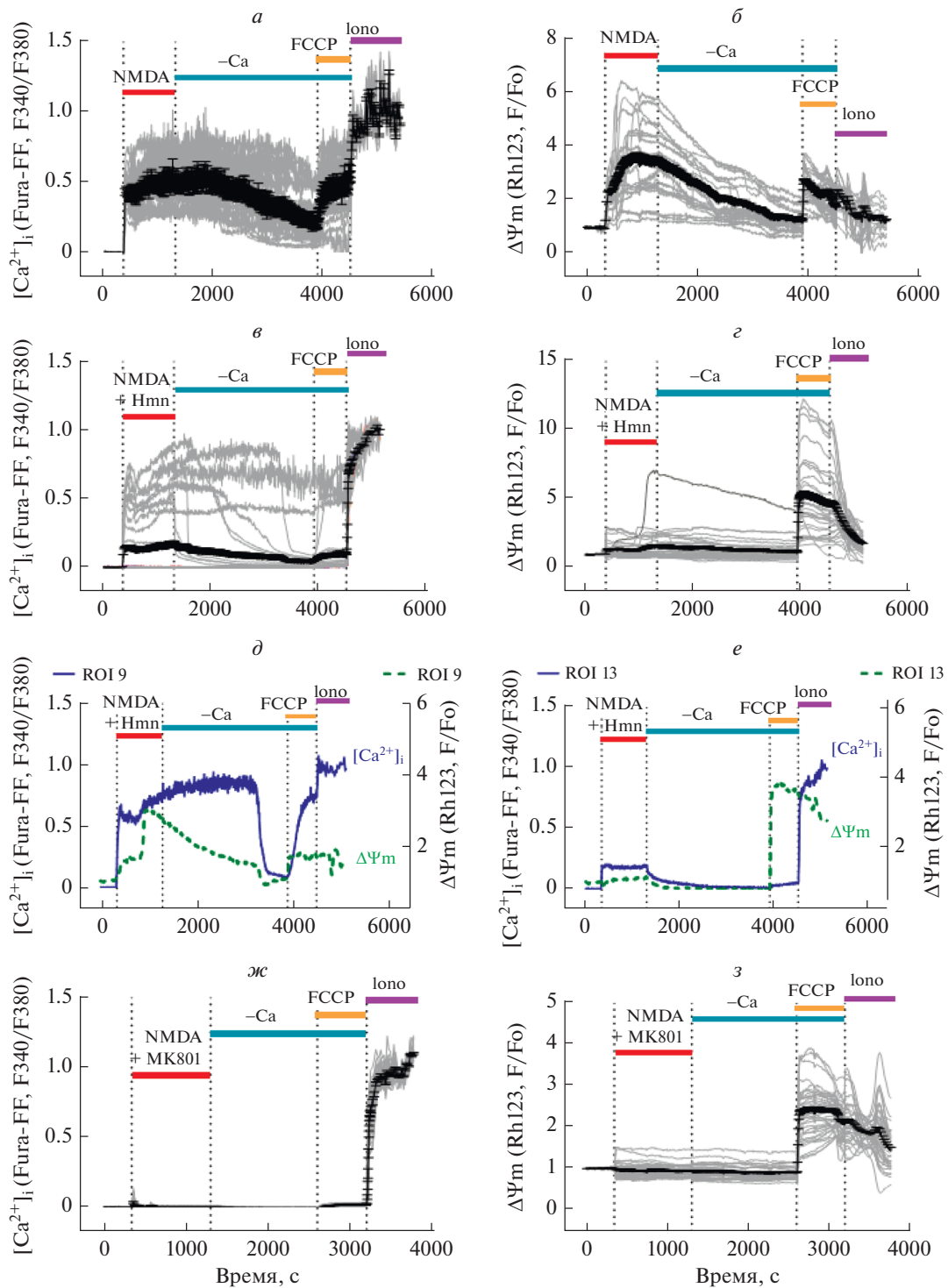
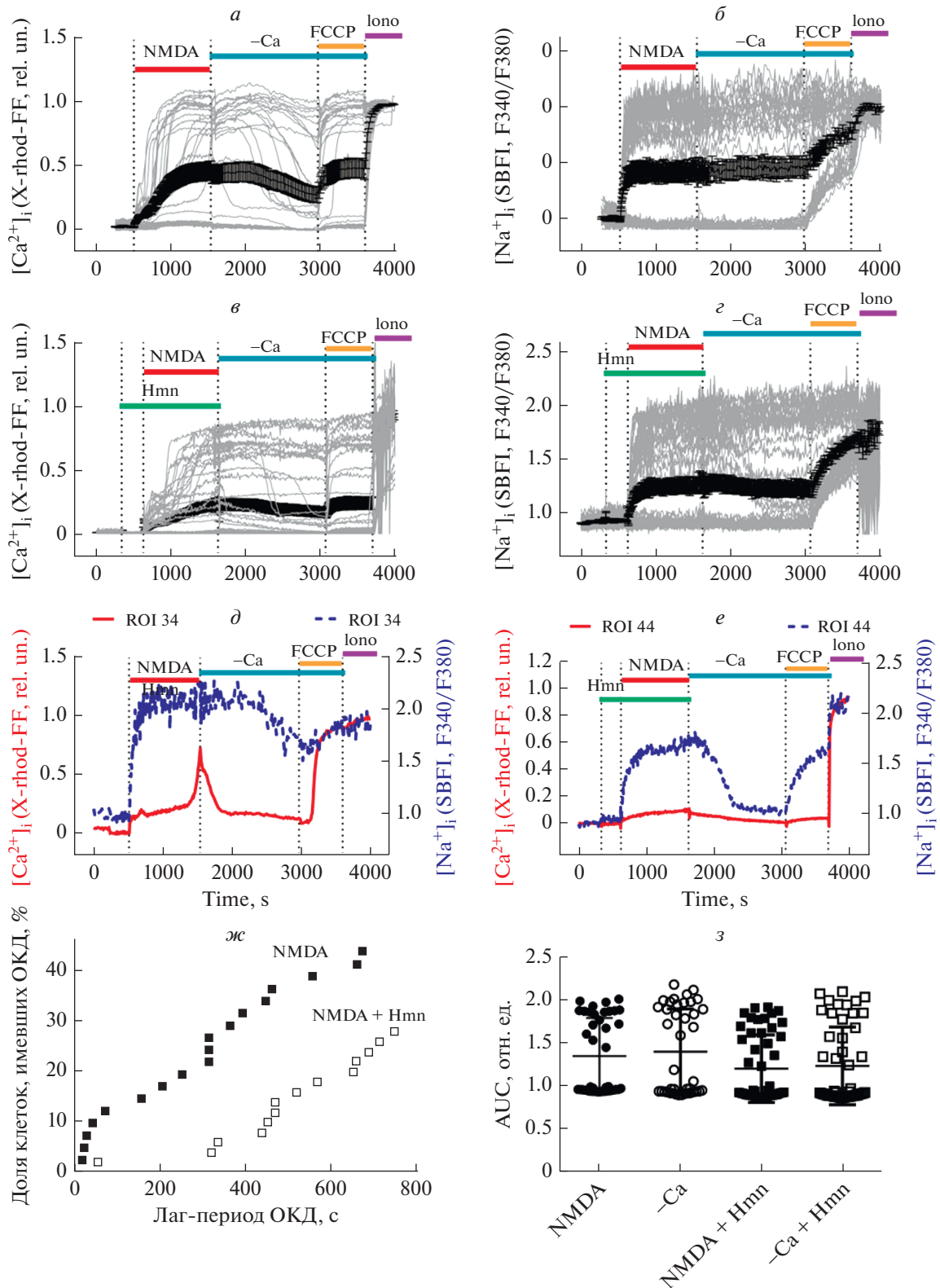


Рис. 4. Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$), вызванные добавлением одного NMDA и в присутствии обратимого (гимантана, Hmn) и необратимого (МК-801) ингибиторов NMDA-каналов. Серыми линиями показаны графики $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ индивидуальных клеток, черными линиями – средние значения ($\pm$ ошибка среднего). *а* – изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в контрольном эксперименте при действии одного NMDA (500 мкМ), *в* – в присутствии Hmn (100 мкМ) и *ж* – в присутствии МК-801 (10 мкМ). Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ измерены, как сказано в подписи к рис. 2. *б*, *г*, *з* – изменения величины митохондриального потенциала $\Delta\Psi_m$ выполнены с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда родамина-123 (Rh123). Сигналы Rh123 (F) нормированы относительно исходной величины в покое в нейронах (F₀). *д*, *е* – изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ совмещены для двух представительных нейронов, один из которых имел ОКД (*д*), а другой устоял против развития ОКД (*е*). Клеточная культура кортикальных нейронов в возрасте 14 дней. Концентрации (мкМ): NMDA – 500, Gly – 10, Hmn – 100, МК-801 – 10. NMDA добавляли в безмагниеовом буфере.



способны оказать заметного эффекта на уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [7].

Второе отличие данных кальциевого имиджинга от электрофизиологических измерений состоит в том, что Hmnp (100 мкМ) ингибировал рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на ~50% в тех клетках (~30% от общего числа $n = 29$), в которых индуцированный NMDA рост был обратим (рис. 2в). Ни в одном нейроне не отмечалось 90% ингибирования. Возможно, это отличие связано с типом клеток. В настоящей работе это нейроны из коры головного мозга 1-дневных крыс после 12 дней содержания в культуре, тогда как в работах [17, 18] использовали механически диссоциированные нейроны из свежесекционированного среза мозга крысы 2–3 месячного возраста. Эти различия могли проявиться в отличиях в субъединичном составе NMDA-рецепторов, других компонентов клетки, оказывающих влияние на функционирование рецепторов. Аффинность Hmnp к NMDA рецепторам в полученных нами культурах могла быть заметно ниже, чем в остро изолированных нейронах из среза мозга и, соответственно, ингибирование менее эффективным. Другими словами, в части нейронов Hmnp не входил в канал NMDA рецептора либо перекрывал его не полностью и поэтому в этих нейронах сохранялся, хоть и пониженный, транспорт Ca^{2+} и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ не опускалась на 90% относительно амплитудной величины.

Поскольку Hmnp подобно Mg^{2+} ингибирует ионный канал NMDA-рецептора потенциал-зависимым образом, мы ожидали подобия в изменениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при действии NMDA в присутствии ингибирующих концентраций Hmnp и Mg^{2+} . Оказалось, что Mg^{2+} (10 мМ) снижал площадь под кривой вызванных NMDA изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ тем сильнее, чем больше входило Ca^{2+} в этот нейрон при действии одного NMDA (рис. 3а). Поэтому индуцированный NMDA подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в присутствии высокой концентрации Mg^{2+} в буфере (10 мМ) был примерно одинаковым для клеток, имевших 3-кратное различие в соотношении скоростей поступления Ca^{2+} в цитоплазму и удалении из нее (3-кратное различие площадей под кривыми из-

менений $[\text{Ca}^{2+}]_i$). В то же время, Hmnp (100 мкМ) в одинаковой степени снижал рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках с высоким и с низким подъемом $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Поэтому динамическое равновесие между поступлением Ca^{2+} в цитоплазму и его удалением из нее имело характер прямой пропорциональной зависимости (рис. 3б). Это наблюдение свидетельствует о том, что, несмотря на расположение внутри канала, Mg^{2+} и Hmnp по-разному ограничивают поток Ca^{2+} через NMDA-канал, что согласуется с моделью, предложенной в работе [17, 18] о том, что Mg^{2+} и Hmnp располагаются на разной “глубине” внутри канала (на разном расстоянии от внутренней поверхности плазматической мембраны).

Высокие концентрации глутамата вызывают кальциевую дисрегуляцию (ОКД), которая происходит синхронно с сильной митохондриальной деполяризацией [6, 7]. На рис. 4д и 4е совмещены для наглядности изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ двух нейронов, в одном из которых (рис. 4д) за время действия NMDA развилась ОКД и сильное падение $\Delta\Psi_m$ (рост флуоресценции Rh123 во время вторичного подъема $[\text{Ca}^{2+}]_i$). Hmnp не нарушил синхронность развития ОКД и падение $\Delta\Psi_m$, снижая долю нейронов, в которых развилась ОКД, и, соответственно, долю нейронов, в которых происходила сильная митохондриальная деполяризация (рис. 4а–4е). Неконкурентный ингибитор NMDA-рецепторов МК-801 (10 мкМ) вызывал практически полное блокирование индуцированных NMDA изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, причем во всех нейронах (рис. 4ж, з). Менее сильное ингибирование гимантаном роста $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и падения $\Delta\Psi_m$, связано, по-видимому, с тем, что МК-801 ингибирует NMDA-рецепторы не независимо от величины потенциала плазмалеммы, тогда как действие Hmnp зависит от этого потенциала [17, 18].

В зрелых нейрональных культурах часто наблюдается спонтанная активность, проявляющаяся в снижении потенциала плазматической мембраны и входе Ca^{2+} по потенциал- и лиганд-зависимым каналам [29–31]. Возможно, эта спонтанная активность является одной из причин гетерогенности

Рис. 5. Изменения внутриклеточной концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^{+}]_i$, вызванные добавлением NMDA и гимантана Hmnp. Серыми линиями показаны графики $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^{+}]_i$ индивидуальных клеток, черными линиями – средние значения ($\pm$ ошибка среднего). а, в – измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ выполнены с помощью флуоресцентного Ca^{2+} -индикатора X-rhod-FF. б, г – изменения $[\text{Na}^{+}]_i$ представлены как отношения сигналов флуоресцентного Na^{+} -индикатора SBF1, измеренных при возбуждении на 340 и 380 нм (F340/F380) и регистрации при 525 нм; значения F340/F380 нормированы относительно исходной величины в покоящихся нейронах. ж – зависимость доли клеток, имевших ОКД от лаг-периода ОКД (определение лаг-периода см. раздел “Материалы и методы”). д, е – изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^{+}]_i$ совмещены для двух представительных нейронов, в одном из которых (д) началось развитие ОКД. з – площади под графиками изменения $[\text{Na}^{+}]_i$ во время действия одного NMDA или NMDA + Hmnp, а также в период после удаления NMDA (-Ca) или удаления (-Ca + Hmnp). Клетки нагружали Ca^{2+} и Na^{+} индикаторами как описано в разделе “Материалы и методы”. Клеточная культура кортикальных нейронов в возрасте 12 дней. Концентрации добавляемых агентов как на рис. 4.

$[Ca^{2+}]_i$ ответов нейронов на блокирующее действие Hmnp.

Известно, что ионные каналы NMDA-рецепторов хорошо проницаемы не только для Ca^{2+} , но также для Na^+ и K^+ . В культуре кортикальных нейронов Hmnp (100 мкМ) вызывал лишь частичное ингибирование роста $[Ca^{2+}]_i$, удлиняя лаг-период развития ОКД (рис. 5ж). Hmnp не оказывал заметного влияния на изменения $[Na^+]_i$ при совместном добавлении с NMDA по сравнению с действием одного этого агониста, хотя прослеживалась тенденция к снижению общего количества Na^+ прошедшего сквозь цитозоль (рис. 5з). Причиной неодинакового ингибирования изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$, неконкурентными ингибиторами NMDA-каналов, включая Hmnp, может быть, помимо отмеченной выше спонтанной электрической активности нейрональной культуры, то, что активация NMDA-рецепторов вызывает реверсию Na^+/Ca^{2+} -обмена [27].

В заключение отметим следующее. Быстрая обратимость ингибирования NMDA-каналов может благоприятствовать нормализации функционирования мозга после отмены применения Hmnp. Более эффективное блокирование входа Ca^{2+} по сравнению с Na^+ будет сильнее ингибировать нейротоксическое воздействие Ca^{2+} , при этом в меньшей степени снижая поступление Na^+ , его деполяризующий эффект на плазматическую мембрану и, соответственно, передачу электрического сигнала между нейронами.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено согласно Гос. заданию № 0520-2019-0029 и АААА-А19-119012590191-3.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. 2010), а также в соответствии с “Правилами надлежащей лабораторной практики”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amenta F, Zaccheo D., Collier W.L. // Mech. Ageing Dev. 1991. V. 61. № 3. P. 249–273.

2. Колачева А.А., Козина Е.А., Хакимова Г.Р., Кучеряну В.Г., Кудрин В.С., Нигматуллина Р.Р., Базян А.С., Григорьян Г.А., Угрюмов М.В. Экспериментальное моделирование болезни Паркинсона в книге НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: от генома до целостного организма. // Под ред. Угрюмова М.В.. М.: Научный мир, 2014. Т. 1. С. 356–422.
3. Николлс Д.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Д., Фукс П.А. // От нейрона к мозгу. М.: Издательство Научной и учебной литературы УРСС, 2003. 671 с.
4. Sobolevsky A.I. // J. Physiol. 2015. V. 593. № 1. P. 29–38.
5. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. // Trends Neurosci. 1999. V. 22. № 9. P. 391–397.
6. Nicholls D.G., Budd S.L. // Physiol. Rev. 2000. V. 80. № 1. P. 315–360.
7. Khodorov B. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2004. V. 86. № 2. P. 279–351.
8. Hardingham G.E. // Biochem. Soc. Trans. 2009. V. 37. № 6. P. 1147–1160.
9. Hardingham G.E., Bading H. // Nat. Rev. Neurosci. 2010. V. 11. № 10. P. 682–696.
10. Chen H.S.V., Pellegrini J.W., Aggarwal S.K., Lei S.Z., Warach S., Jensen F.E., Lipton S.A. // J. Neurosci. 1992. V. 12. № 11. P. 4427–4436.
11. Parsons C.G., Danysz W., Quack G. // Neuropharmacology. 1999. V. 38. № 6. P. 735–767.
12. Chen H.S.V., Lipton S.A. // J. Neurochem. 2006. V. 97. № 6. P. 1611–1626.
13. Stayte S., Vissel B. // Front. Neurosci. 2014. V. 8. article 113.
14. Freitas M.E., Fox S.H. // Neurodegener. Dis. Manag. 2016. V. 6. № 3. P. 249–268.
15. Капица И.Г., Иванова Е.А., Авдюнина Н.И., Воронина Т.А. // Хим.-фарм. журн. 2019. Т. 53. № 5. С. 3–7.
16. Olivares D., Deshpande V.K., Shi Y., Lahiri D.K., Greig N.H., Rogers J.T., Huang X. // Curr. Alzheimer Res. 2013. V. 9. № 6. P. 746–758.
17. Sobolevsky A.I., Yelshansky M.V. // J. Physiol. 2000. V. 526. № 3. P. 493–506.
18. Елшанская М.В., Соболевский А.И., Вальдман Е.А., Ходоров Б.И. // Эксперим. и клин. фармакол. 2001. Т. 64. № 1. С. 18–21.
19. Воронина Н.А., Кучеряну В.Г., Капица И.Г., Воронина Т.А. // Патогенез. 2019. Т. 17. № 4. С. 57–62.
20. Иванова Е.А., Капица И.Г., Золотов Н.Н., Вальдман Е.А., Непоклонов А.В., Колясникова К.Н., Воронина Т.А. // Фармакокинетика и Фармакодинамика. 2016. Т. 3. С. 9–12.
21. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., Demchenko A., Pomytkin I., Pinelis V. // Front. Neurosci. 2019. V. 13. article 1027.
22. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Авдюнина Н.И., Морозов И.С., Быков Н.П., Неробкова Л.Н. Гидрохлорид N-2-адамантил)-гексаметиленмина, обладающий антикаталептической активностью.: патент № 1825499 Россия, 1991.
23. Nerobkova L.N., Val'dman E.A., Voronina T.A., Markina N.V., Sharkova L.M. // Eksp Klin Farmakol. 2000. V. 63. № 3. P. 3–6.

24. Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Горбачева Л.Р., Сурин А.М. // Биол. мембраны. 2018. Т. 35. № 5. С. 384–397.
25. Vergun O., Keelan J., Khodorov B.I., Duchon M.R. // J. Physiol. 1999. V. 519. № 2. P. 451–466.
26. Duchon M.R., Surin A., Jacobson J. // Methods Enzymol. 2003. V. 361. P. 353–389.
27. Brittain M.K., Brustovetsky T., Sheets P.L., Brittain J.M., Khanna R., Cummins T.R., Brustovetsky N. // Neurobiol. Dis. 2012. V. 46. № 1. P. 109–117.
28. Ходоров Б.И., Сторожевых Т.П., Сурин А.М., Сорокина Е.Г., Юрвичус А.И., Бородин А.В., Винская Н.П., Хаспеков Л.Г., Пинелис В.Г. // Биол. мембраны. 2001. Т. 18. № 6. С. 421–432.
29. Генрихс Е.Е., Александрова О.П., Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Воронков Д.Н., Исаев Н.К., Хаспеков Л.Г. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2019. Т. 13. № 4. С. 38–45.
30. Зинченко В.П., Туровская М.В., Теплов И.Ю., Бережнов А.В., Туровский Е.А. // Биофизика. 2016. Т. 61. № 1. С. 102–111.
31. Agrawe Z., Patel N., Vyas Y., Bansal M., Montgomery J., Travas-Sejdic J., Svirskis D. // PLoS One. 2020. V. 15. № 8.

Influence of Hemantane on Changes in Ca^{2+} and Na^{+} , Caused by Activation of NMDA Channels in Cultivated Rat Brain Neurons

N. A. Voronina^a, O. Yu. Lisina^a, I. A. Krasilnikova^b, V. G. Kucheryanu^a,
I. G. Kapitsa^c, T. A. Voronina^c, and A. M. Surin^{a, b}

^a*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya str. 8, Moscow, Russia*

^b*National Medical Research Center of Children's Health, Lomonosovsky av. 2/1, Moscow, Russia*

^c*Zakusov Research Institute of Pharmacology, Baltiyskaya str. 8, Moscow, Russia*

In Parkinson's disease, one of the leading mechanisms of neurodegeneration is the excitotoxicity of glutamate, the main excitatory brain neurotransmitter. The excitotoxicity develops as a result of excessive stimulation of ionotropic NMDA-type glutamate receptors. Drugs reversibly inhibiting NMDA receptors are considered as promising pharmacological agents to prevent the death of neurons and slow down neurodegeneration. In this work, we studied the effect of N-(2-adamantyl)-hexamethyleneimine hydrochloride (hemantane) on changes in the intracellular concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), Na^{+} ($[\text{Na}^{+}]_i$) and mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) induced by NMDA in cultured neurons. Cultures were prepared from the cerebral cortex of 1–2-day-old Wistar rats. Experiments with animals were performed in accordance with the ethical principles and regulatory documents recommended by the European Convention on the Protection of Vertebrate Animals. The measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^{+}]_i$ and $\Delta\Psi_m$ were performed employing fluorescence microscopy system based on an Olympus IX-71 inverted microscope with a Sutter Lambda 10-2 multi-wavelength illumination system and a cooled CoolSnap HQ CCD camera. The system was controlled using the MetaFluor software. It was shown that short-term subtoxic doses of NMDA (2–3 min, 10 μM) cause a rapid rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which is reversibly inhibited by high concentrations of Mg^{2+} (10 mM) and hemantane (100 μM). The prolonged administration of the neurotoxic NMDA concentration (20 min, 500 μM) caused the development of delayed calcium deregulation (DCD), a steady rise in $[\text{Na}^{+}]_i$ and a profound drop in $\Delta\Psi_m$. Hemantane (100 μM) reduced the growth of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, postponed the development of DCD, reduced mitochondrial depolarization and helped restore the initial values of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^{+}]_i$ and $\Delta\Psi_m$ after the NMDA withdrawal. Unlike hemantane, the high-affinity non-competitive inhibitor of NMDA channels MK-801 irreversibly blocked changes of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $\Delta\Psi_m$, even at high NMDA concentration (500 μM). Obviously, hemantane exhibits neuroprotective properties due to a decrease in Ca^{2+} and Na^{+} fluxes through NMDA channels and a lower growth of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^{+}]_i$. The reversibility of NMDA channels inhibition favors the normalization of brain functioning after termination of hemantane administration.

Keywords: glutamate, receptors, hemantane, calcium, sodium, mitochondrial potential

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.112.7

АЛЬФА-СИНУКЛЕИН В КРОВИ У МЫШЕЙ НА НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2021 г. В. Е. Блохин¹*, М. В. Угрюмов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.04.2020 г.

После доработки 25.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Одним из приоритетов нейронауки является борьба с социально значимыми нейродегенеративными заболеваниями, к которым относится болезнь Паркинсона (БП). Учитывая ограниченные возможности изучения патогенеза этого заболевания, важное значение приобретает создание и детальное изучение соответствующих экспериментальных моделей. Поэтому целью данной работы явилось продолжение многолетних исследований клеточных и молекулярных механизмов патогенеза болезни Паркинсона и их системных проявлений при моделировании этого заболевания у мышей с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП). В данной работе с помощью Вестерн блота показано, что у мышей на МФТП-модели клинической стадии БП в плазме крови практически вдвое снижается отношение мономерного α -синуклеина к олигомерному и наблюдается тенденция к снижению отношения общего α -синуклеина к фосфорилированному по серину-129. По данным ряда исследований, такие изменения характерны для больных при БП. В отличие от плазмы, в лимфоцитах не было обнаружено изменения соотношения указанных белков. Из совпадения наших данных по содержанию α -синуклеина и его изоформ в крови у паркинсонических мышей и данных литературы по содержанию α -синуклеина у больных при БП следует, что наша модель БП может быть использована для углубленной оценки периферических проявлений этого заболевания, а также для усовершенствования дифференциальной диагностики БП, анализа эффективности используемой терапии и скрининга новых лекарственных средств.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, МФТП-модель, альфа-синуклеин

DOI: 10.31857/S1027813321010027

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших приоритетов современной нейронауки является борьба с социально значимыми нейродегенеративными заболеваниями — в первую очередь с болезнью Альцгеймера и болезнью Паркинсона (БП) [1]. При этом к наиболее актуальным задачам относится изучение клеточных и молекулярных механизмов патогенеза этих болезней и, в соответствии с методологией трансляционной медицины, разработка ранней и дифференциальной диагностики, а также усовершенствование существующей симптоматической терапии и превентивной нейропротекторной терапии [2]. Однако возможности для изучения механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний у больных по ряду причин крайне ограничены. Так, клинические исследования ограничены тем, что нейродегенеративные заболевания диагностируют по характерным симптомам только

через 20–30 лет после начала патологического процесса. Патологоанатомические исследования ограничены тем, что больные умирают уже при полной деградации ключевых регуляторных систем мозга и исчерпания компенсаторных резервов организма [3].

Ограничения в исследовании молекулярных механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний у человека можно отчасти компенсировать путем их изучения на экспериментальных моделях. При этом необходимо учитывать, что модели любого заболевания способны адекватно воспроизводить только отдельные элементы патогенеза. Поэтому разработке моделей нейродегенеративных заболеваний и их сравнению с патогенезом у больных уделяется большое внимание [4]. Только после тщательного изучения экспериментальных моделей и получения доказательств их соответствия по определенным метаболическим путям патогенезу БП, они могут быть использованы для разработки инновационных методов диагностики и лечения.

* Адресат для корреспонденции: 119334 Россия, Москва, ул. Вавилова, 26, тел./факс (499)135-88-42; e-mail: victor.blokhin@hotmail.com.

Целью данной работы явилось продолжение многолетних исследований клеточных и молекулярных механизмов патогенеза БП и их системных проявлений — физиологических, биохимических и молекулярно-биологических — у мышей при моделировании этого заболевания с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП). МФТП — предшественник нейротоксина, который в организме превращается в МФП+ — специфический токсин дофаминергических нейронов [5]. С помощью МФТП удается воспроизвести гибель дофаминергических нейронов нигростриатной системы мозга — ключевого звена регуляции моторной функции, а также ряд других центральных и периферических элементов патогенеза БП [6]. По данным литературы, на МФТП-моделях, наряду с дегенерацией нигростриатных дофаминергических нейронов, воспроизводится и второй ключевой механизм патогенеза БП — нарушение метаболизма альфа-синуклеина [7]. При α -синуклеинопатии происходит внутринейрональное накопление и агрегация α -синуклеина, который приобретает цитотоксические свойства, вызывая дегенерацию центральных и периферических нейронов. Считается, что секретируемый агрегированный токсичный α -синуклеин быстро распространяется по организму у больных прионоподобным способом — от нейрона к нейрону или через гуморальные среды (ликвор, кровь), вызывает системную нейродегенерацию [8]. В данной работе была поставлена задача впервые оценить содержание α -синуклеина в крови у мышей на модели ранней клинической стадии БП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В данной работе использованы 20 самцов мышей линии C57Bl/6J в возрасте от 2 до 2.5 мес. и весом от 23 до 25 г. Животных содержали в виварии с 12 часовым циклом дня и ночи и свободным доступом (*ad libitum*) к пище и воде. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с национальными и международными требованиями и правилами, утвержденными комитетом по охране животных ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Протокол № 27 от 04.07.2019 г.

Моделирование болезни Паркинсона и подготовка для анализа. Мышам в контрольной группе ($n = 10$) 4 раза с интервалом в 2 ч подкожно вводили физиологический раствор. Для моделирования БП мышам ($n = 10$) четырежды с интервалом в 2 ч подкожно вводили МФТП в физрастворе (Sigma-Aldrich, США) в однократной дозе 10 мг/кг. Через 2 нед. после введения МФТП или физраствора мышей наркотизировали изофлураном (KentScientific, США), декапитировали, собирали кровь из шеи и вычленили мозг.

Из мозга при 4°C под контролем бинокулярной лупы выделяли росто-дорзальную область стриатум — центральное звено регуляции моторной функции, в соответствии с атласом мозга мышей [9]. Стриатум взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C до измерения содержания дофамина. Кровь собирали в 1.5 мл пробирки, содержащие 20 мкл 5%-го раствора ЭДТА (Sigma-Aldrich, США). Общий объем раствора доводили до 1 мл фосфатносолевым буфером (ФСБ) и этот раствор аккуратно наслаивали в 15 мл пробирки содержащие 5 мл раствора фикола ($p = 1.09$). Полученную смесь центрифугировали в течение 15 мин при 4°C со скоростью 1500 об./мин. Из расслоившейся после центрифугирования крови отбирали плазму и лимфоциты. Фракцию лимфоцитов дополнительно центрифугировали 10 мин при 10000 об./мин и промывали трижды раствором ФСБ, центрифугируя 5 мин после каждого промывания при скорости 10000 об./мин. Полученные образцы плазмы и лимфоцитов замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C до дальнейшего анализа.

Определение содержания дофамина в образцах стриатума. Содержание дофамина в образцах стриатума определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД) по описанной ранее методике [10]. Перед измерением дофамина в образцы ткани добавляли 400 мкл раствора 0.1 М HClO_4 и 250 пМ 2,3-дигидроксibenзойной кислоты (ДГБА, внутренний стандарт) и их гомогенизировали при 4°C. Часть гомогената отбирали для измерения концентрации белка с помощью набора “BCA Protein Assay Kit” по протоколу производителя (The Thermo Scientific Pierce, США). Остаток гомогената ткани центрифугировали 20 мин со скоростью 18000 g при 4°C. Супернатант отбирали для измерения дофамина в тканях стриатума.

Определение дофамина проводили на обращенно-фазовой колонке (100 × 4 мм ReproSil-Pur C18, 3 мкм) (Dr. Maisch, Германия). Подвижной фазой служил 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0.25 мМ октансульфоната натрия, 0.1 М ЭДТА и 6% ацетонитрила (pH 2.55). Потенциал веществ, выходящих из колонки, определяли с помощью электрохимического детектора DECADE II (Antec Leyden, Нидерланды). Пики дофамина и внутреннего стандарта (ДГБА) идентифицировали по времени выхода относительно раствора внешних стандартов (ДГБА и дофамина). Содержание дофамина рассчитывали как отношение площадей пиков в образце к стандартам (рис. 1a). Площадь пиков измеряли с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu, Япония). Содержание дофамина нормировали на концентрацию белка.

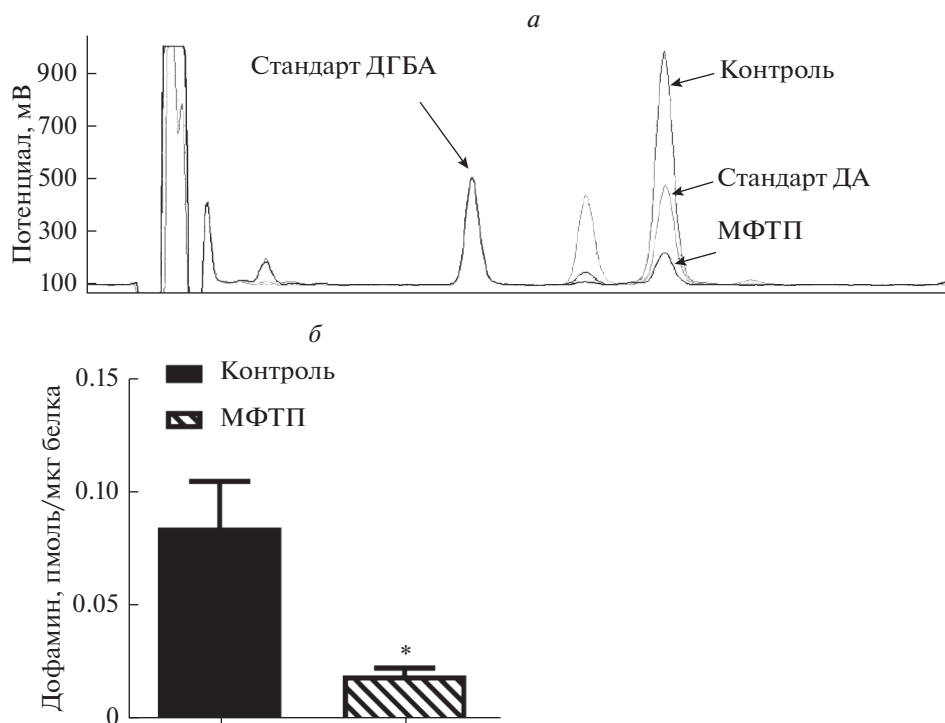


Рис. 1. Определение уровня дофамина (ДА) в стриатуме у мышей через 2 нед. после четырехкратного подкожного введения физраствора (контроль) или четырехкратного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) в разовой дозе 10 мг/кг (модель болезни Паркинсона). *а* – Хроматограмма выхода пиков стандартов 2,3-дигидроксibenзойной кислоты (ДГБА) и дофамина (ДА), а также пик ДА у мышей в контроле и после введения МФТП. *б* – Концентрация ДА (пмоль/мкг белка) в стриатуме у мышей после введения физраствора или МФТП. * $P < 0.05$.

Определение соотношения мономерного и олигомерного α -синуклеина в крови

В плазме и лимфоцитах с помощью Вестерн блота определяли содержание мономерного и олигомерного α -синуклеина, а также общего и фосфорилированного по серину-129 α -синуклеина. В конечном итоге с помощью анализа изображений и программного обеспечения рассчитывали отношения между различными изоформами α -синуклеина – мономерный/олигомерный, общий/фосфорилированный. Перед измерением α -синуклеина образцы плазмы и лимфоцитов размораживали. Далее плазму разводили в 5 раз RIPA-буфером, отбирали 10 мкл полученного раствора для определения концентрации белка в плазме при помощи ВСА-метода, согласно протоколу производителя. К лимфоцитам добавляли 100 мкл RIPA-буфера и гомогенизировали ультразвуком. После этого отбирали 10 мкл полученного гомогената для определения концентрации белка в лимфоцитах при помощи ВСА-метода согласно протоколу производителя.

Для фореа брали 25 мкг белка на 1 пробу и смешивали с SLB-буфером в соотношении 1 : 2 (v/v). Разделение белков производили в акриламид/бисакриламидном геле, состоящем из 4%-го концентрирующего геля и 14%-го разделяющего ге-

ля. Длительность фореа составляла 90 мин, из которых 20 мин – при 80 мВ, а 70 мин – при 180 мВ. Далее осуществляли мокрый перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану в течение 75 мин при 290 мА. Перенос белков подтверждали окраской Ронсеау. Мембраны отмывали в TNT буфере 3 раза по 5 мин, а затем блокировали 5%-м раствором сухого обезжиренного молока 1 ч. Далее мембраны инкубировали с первыми антителами к α -синуклеину (кролик, 1 : 250, SanaCruz, США), либо фосфорилированному α -синуклеину по серину-129 (кролик, 1 : 750, Invitrogen, USA) в течение 24 ч, отмывали TNT буфером 3 раза по 10 мин. После этого мембраны инкубировали 2 ч со вторыми антителами иммунореактивными к гамма-глобулинам кролика, связанными с пероксидазой хрена (Sigma, США). Затем мембраны отмывали TNT буфером 3 раза по 5 мин и проявляли при помощи раствора ECL (Bio-Rad) согласно протоколу производителя. В ходе реакции пероксидазы хрена с субстратом выделялась хемилюминесценция, которую детектировали при помощи прибора ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Полученные изображения мембран анализировали с помощью программного обеспечения ImageLab для получения значений интенсивности свечения (Volume Intensity) (Bio-Rad, США).

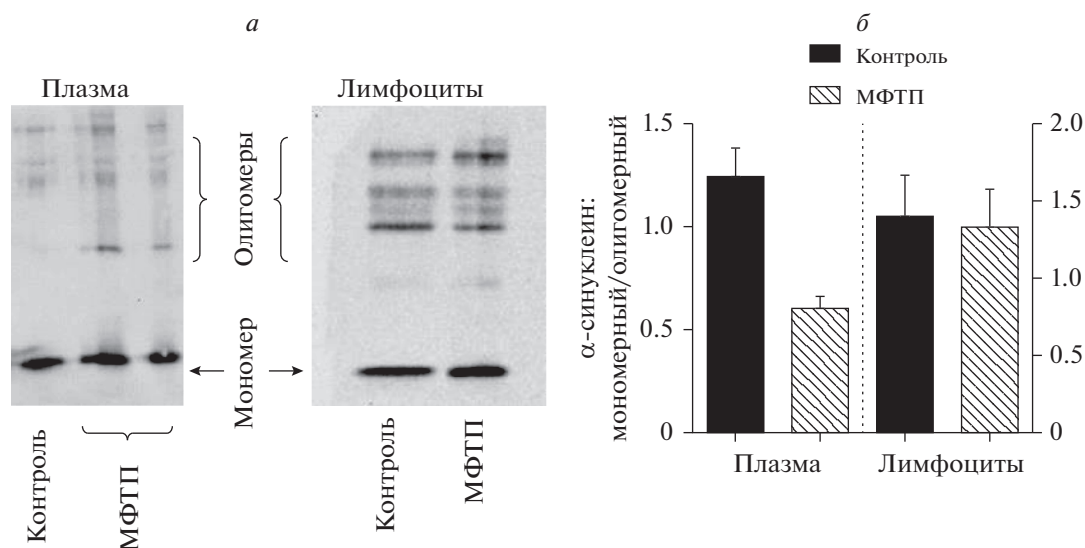


Рис. 2. Выявление с помощью Вестерн блота мономерного и олигомерного α -синуклеина в плазме и в лимфоцитах у мышей через 2 нед. после четырехкратного подкожного введения физраствора (контроль) или четырехкратного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) в разовой дозе 10 мг/кг (модель болезни Паркинсона). *а* – Мембраны после выявления α -синуклеина. В плазме и в лимфоцитах наблюдается разделение олигомерных форм α -синуклеина по массам, у мышей получавших инъекции МФТП содержание олигомеров увеличивается. В лимфоцитах также наблюдается разделение олигомерных форм α -синуклеина, однако изменений по содержанию α -синуклеина не наблюдается. *б* – Отношение содержания мономерного α -синуклеина к содержанию олигомерного α -синуклеина в плазме и в лимфоцитах у мышей после введения физраствора или МФТП. * $P < 0.05$.

Статистическая обработка. Полученные данные были статистически обработаны при помощи программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Для статистического сравнения выбранных групп использовали t -тест Стьюдента. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым.

Отношение мономерного α -синуклеина к олигомерному α -синуклеину рассчитывали как:

$$\Delta = \text{ХЛ}_{\text{моно}} / \text{ХЛ}_{\text{олиго}}$$

$\text{ХЛ}_{\text{моно}}$ – показатель хемилюминесценции мономерного α -синуклеина,

$\text{ХЛ}_{\text{олиго}}$ – показатель хемилюминесценции олигомерного α -синуклеина.

Отношение общего α -синуклеина к фосфорилированному α -синуклеину рассчитывали как:

$$\Delta = (\text{ХЛ}_{\text{моно}} + \text{ХЛ}_{\text{олиго}}) / \text{ХЛ}_{\text{фосфо}}$$

$\text{ХЛ}_{\text{моно}}$ – показатель хемилюминесценции мономерного α -синуклеина,

$\text{ХЛ}_{\text{олиго}}$ – показатель хемилюминесценции олигомерного α -синуклеина,

$\text{ХЛ}_{\text{фосфо}}$ – показатель хемилюминесценции фосфорилированного α -синуклеина.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень дофамина в стриатуме. С помощью ВЭЖХ показано, что концентрация дофамина в стриатуме у мышей через 2 нед. после четырехкратного введения МФТП в однократной дозе 10 мг/кг снизилось на 76.5% по отношению к контролю после введения по той же схеме физраствора (рис. 1).

Соотношение содержания мономерного и олигомерного α -синуклеина в крови. Показано, что в плазме у мышей в контроле отношение мономерного альфа-синуклеина к олигомерному альфа-синуклеину в плазме равно 1.238, а в лимфоцитах – 1.404. У мышей через 2 нед. после введения МФТП отношение содержания мономерного α -синуклеина к олигомерному альфа-синуклеину в плазме равно 0.609, а в лимфоцитах – 1.339 (рис. 2).

Соотношение содержания общего и фосфорелированного по серину-129 α -синуклеина. Показано, что в плазме у мышей в контроле отношение содержания общего α -синуклеина к фосфорелированному α -синуклеину в плазме равно 5.138, а в лимфоцитах – 10.437. У мышей через 2 нед. после введения МФТП отношение содержание общего α -синуклеина к фосфорелированному α -синуклеину в плазме равно 3.656, а в лимфоцитах – 12.541 (рис. 3).

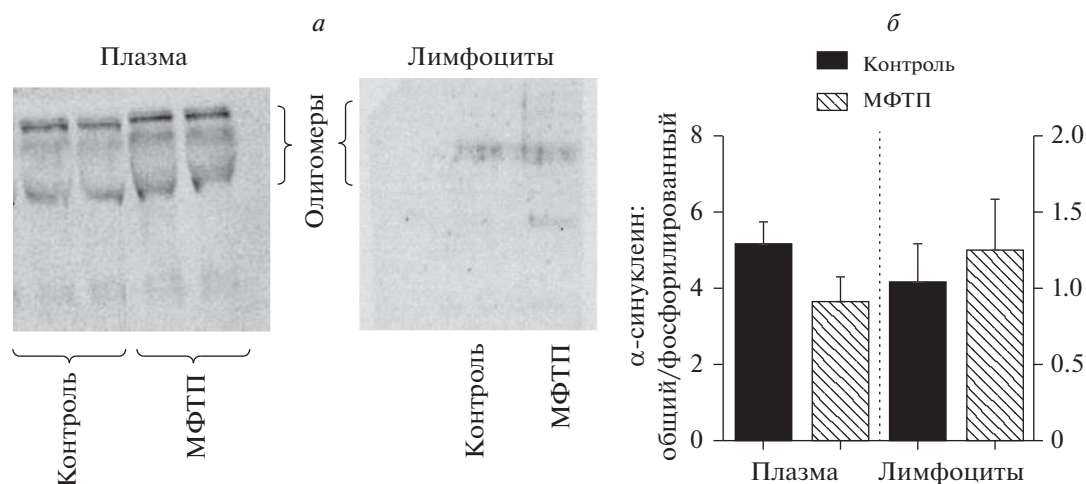


Рис. 3. Выявление с помощью Вестерн блота общего и фосфорилированного по серину-129 α -синуклеина в плазме и в лимфоцитах у мышей через две недели после четырехкратного подкожного введения физраствора (контроль) или четырехкратного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) в разовой дозе 10 мг/кг (модель болезни Паркинсона). *а* – Мембраны после выявления фосфорилированного по серину-129 α -синуклеина. В плазме наблюдается разделение по массам на 2 подгруппы фосфорилированного α -синуклеина, у мышей получавших инъекции МФТП его содержание увеличивается. В лимфоцитах изменений по содержанию фосфорилированного по серину-129 α -синуклеина не наблюдается. *б* – Отношение содержания общего α -синуклеина к содержанию α -синуклеина, фосфорилированного по серину-129, в плазме и в лимфоцитах у мышей после введения физраствора или МФТП. * $P < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многие годы в литературе господствовало представление о том, что α -синуклеинопатия – один из ключевых патогенетических механизмов БП – можно воспроизвести только на трансгенных животных при усилении экспрессии гена α -синуклеина или при снижении экспрессии генов ферментов деградации протеосомной системы [11–13]. Однако моделирование БП на трансгенных животных имеет существенный недостаток – они, как правило, не воспроизводят пороговую деградацию нигростриатной дофаминергической системы при которой нарушается моторное поведение [14].

Оказалось, что поэтапное развитие БП и, в частности, нарушение моторного поведения при пороговой деградации нигростриатной дофаминергической системы можно воспроизвести только на МФТП-моделях [4, 6, 15]. Так, в данной работе использована оригинальная острая модель клинической стадии БП, полученная на мышах с помощью МФТП [4]. Однако, учитывая то, что чувствительность мышей, полученных из разных питомников и в разное время, к МФТП может различаться [16], в данной работе была проведена коррекция режима его применения. В данном исследовании, так же как и в оригинальной работе по созданию модели [4], для воспроизведения ранней клинической стадии БП мышам четырехкратно с интервалом 2 ч подкожно вводили МФТП, однако в несколько меньшей разовой дозе – 10 мг/кг.

Оценка роли МФТП-моделей в изучении механизмов патогенеза БП значительно повысилась в последнее десятилетие. Так, в частности, было показано, что воздействие МФТП на мышей приводит к увеличению содержания в нигростриатной системе и в ряде других областей мозга α -синуклеина и его нейротоксичных изомеров – агрегированного и фосфорелированного по серину-129 α -синуклеина, что описано в ряде работ, но не во всех у больных при БП [7, 17–19]. Так, у ряда больных при БП отсутствует синуклеинопатия, и в этом случае нельзя ожидать изменений в содержании α -синуклеина и его патологических изоформ в гуморальных средах [20]. Более того, было показано, что на МФТП-моделях, как и у больных при БП, повышается проницаемость гематоэнцефалического барьера [17]. Это должно способствовать поступлению патологических белков из мозга в общую систему циркуляции и распространению их цитотоксического действия на периферии. Это не исключает широко распространенных представлений о том, что синуклеинопатия запускается на периферии токсическими внешними факторами микробиоты [21, 22].

Однако до сих пор отсутствуют попытки проверить на нейротоксических моделях БП, отражается ли системная α -синуклеинопатия и повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера на содержании α -синуклеина и его изомеров – агрегированного и фосфорелированного α -синуклеина – в крови у животных, что в ряде работ рассматривается как биомаркеры БП [23, 24].

В проведенном нами исследовании с помощью Вестерн блота показано, что у мышей на МФТП-модели клинической стадии БП в плазме крови практически вдвое снижается отношение мономерного α -синуклеина к олигомерному. Другими словами, у паркинсонических животных вдвое возрастает доля олигомерного токсичного α -синуклеина по сравнению с мономерным нетоксичным α -синуклеином, что хорошо воспроизводит изменение соотношения между содержанием мономерного и олигомерного α -синуклеина в плазме крови, описанные у ряда больных при спорадической БП [23]. В данной работе также показано, что у мышей на МФТП-модели БП в определенной степени воспроизводится увеличение доли фосфорелированного α -синуклеина по сравнению с общим α -синуклеином в плазме, что также описано в литературе [23–25]. Однако при оценке отношения содержания общего α -синуклеина к фосфорелированному α -синуклеину была обнаружена только тенденция к снижению этого показателя ($p = 0.1$).

Учитывая то, что α -синуклеин принимает участие в аутофагии клеток, включая нейроны и лимфоциты [26], особое внимание в данной работе было обращено на экспрессию α -синуклеина и его изомеров — агрегированного и фосфорелированного α -синуклеина — в лимфоцитах у мышей после воздействия МФТП. Однако, в отличие от плазмы, в лимфоцитах не было обнаружено изменения соотношения мономерного и олигомерного α -синуклеина, а также соотношения общего α -синуклеина и фосфорелированного α -синуклеина.

Из сопоставления данных по содержанию α -синуклеина и его изоформ в крови у мышей, полученных в этой работе, и у больных при БП, опубликованных ранее, следует, что, по крайней мере, по соотношению этих белков (α -синуклеин: мономерный/олигомерный, общий/фосфорилированный) в плазме крови наша модель хорошо воспроизводит патогенез БП, по крайней мере, у части больных и может быть использована для оценки периферических проявлений этого заболевания. Эта же модель также может быть использована для усовершенствования дифференциальной диагностики БП, оценки эффективности используемой терапии и скрининга новых лекарственных средств.

Таким образом, используемая нами модель клинической стадии БП у мышей воспроизводит изменения содержания α -синуклеина и его изоформ в плазме крови, характерные для ряда больных при БП, что может быть использовано для углубленной оценки периферических патогенетических процессов, а также для усовершенствования и создания новых технологий диагностики и лечения этого заболевания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ КОМФИ № 18-00-01334.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с национальными и международными требованиями и правилами, утвержденными комитетом по охране животных ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Протокол № 27 от 04.07.2019 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Trompetero A., Gordillo A., Del Pilar M.C., Cristina V.M., Bustos Cruz R.H.* // *Curr. Pharm. Des.* 2018. V. 24. P. 22–45.
2. *Maiti P., Manna J., Dunbar G.L.* // *Transl. Neurodegener.* 2017. V. 6. P. 28–63.
3. *Hartmann A.* // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2004. V. 6. P. 281–293.
4. *Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S.* // *Neuroscience.* 2011. V. 181. P. 175–188.
5. *Przedborski S., Vila M.* // *Adv. Neurol.* 2001. V. 86. P. 177–186.
6. *Meredith and Rademacher* // *J. Parkinsons Dis.* 2011. V. 1. P. 19–33.
7. *Canerina-Amaro A., Pereda D., Diaz M., Rodriguez-Barreto D., Casañas-Sánchez V., Heffer M., Garcia-Esparcia P., Ferrer I., Puertas-Avedaño R., Marin R.* // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 382–403.
8. *Vargas J.Y., Grudina C., Zurzolo C.* // *Ageing Res. Rev.* 2019. V. 50. P. 89–101.
9. *Franklin K.B.J., Paxinos G.* // *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact 3rd Edition.* London: Academic press, 2008.
10. *Kozina E.A., Kim A.R., Kurina A.Y., Ugrumov M.V.* // *Neurobiol. Dis.* 2017. V. 98. P. 108–121.
11. *Chesselet M.F., Fleming S., Mortazavi F., Meurers B.* // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2008 V. 14. P. 1–12.
12. *Bentea E., Verbruggen L., Massie A.* // *J. Parkinson's Dis.* 2017. V. 7. P. 31–63.
13. *Henrich M.T., Geibl F.F., Lee B., Chiu W.H., Koprach J.B., Brotchie J.M., Timmermann L., Decher N., Matschke L.A., Oertel W.H.* // *Acta Neuropathol. Commun.* 2018. V. 6. P. 39–58.
14. *Dawson T.M., Ko H.S., Dawson V.L.* // *Neuron.* 2010. V. 66. P. 646–661.
15. *Muñoz-Manchado A.B., Villadiego J., Romo-Madero S., Suárez-Luna N., Bermejo-Navas A., Rodríguez-Gómez J.A., Garrido-Gil P., Labandeira-García J.L., Echevarría M., López-Barneo J., Toledo-Aral J.J.* // *J. Neurochem.* 2016. V. 136. P. 373–387.
16. *Jackson-Lewis V., Przedborski S.* // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 141–151.

17. Zhang Q.S., Heng Y., Mou Z., Huang J.Y., Yuan Y.H., Chen N.H. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2017. V. 10. P. 1317–1328.
18. Matsuo K., Cheng A., Yabuki Y., Takahata I., Miyachi H., Fukunaga K. // *Neuropharmacology*. 2019. V. 150. P. 164–174.
19. Zhu J., Dou S., Wang C., Jiang Y., Wang C., Cheng B. // *Brain Res.* 2019. V. 1721. P. 1–12.
20. Johansen K.K., Torp S.H., Farrer M.J., Gustavsson E.K., Aasly J.O. // *Case Rep. Neurol. Med.* 2018. V. 2018. P. 2–5.
21. Clairembault T., Leclair-Visonneau L., Coron E., Bourreille A., Le Dily S., Vavasseur F., Heymann M.F., Neunlist M., Derkinderen P. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2015. V. 10. P. 3–12.
22. Tremlett H., Bauer K.C., Appel-Cresswell S., Finlay B.B., Waubant E. // *Ann. Neurol.* 2017. V. 81. P. 369–382.
23. Chen X.Q., Niu J.P., Peng R.Q., Song Y.H., Xu N., Zhang Y.W. // *Acta Neurol. Scand.* 2019. V. 140. P. 268–273.
24. Foulds P.G., Mitchell J.D., Parker A., Turner R., Green G., Diggle P., Hasegawa M., Taylor M., Mann D., Allsop D. // *FASEB J.* 2011. V. 25. P. 4127–4137.
25. El-Agnaf O.M., Salem S.A., Paleologou K.E., Curran M.D., Gibson M.J., Court J.A., Schlossmacher M.G., Allsop D. // *FASEB J.* 2006 V. 20 P. 419–425.
26. Colasanti T., Vomero M., Alessandri C., Barbati C., Maselli A., Camperio C., Conti F., Tinari A., Carlo-Stella C., Tuosto L., Benincasa D., Valesini G., Malorni W., Pierdominici M., Ortona E. // *Cell Death Dis.* 2014. V. 5. P. 1–9.

Alpha-Synuclein in Blood of Mice with Neurotoxic Model of Parkinson's Disease

V. E. Blokhin^a and M. V. Ugryumov^a

^a*Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia*

One of the priorities of neuroscience is the fight against socially significant neurodegenerative diseases, which include Parkinson's disease (PD). Taking into account the limited possibilities of studying the pathogenesis of this disease, the creation and detailed analysis of appropriate experimental models is of great importance. Therefore, the aim of this work was to continue the long-term studies of the cellular and molecular mechanisms of the pathogenesis of Parkinson's disease and their systemic manifestations when modeling this disease in mice using 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). In this study, we showed using Western blot that in the blood plasma of mice with MPTP model of the clinical stage of PD, the ratio of monomeric α -synuclein to oligomeric was almost halved, and there was a tendency to a decrease in the ratio of total α -synuclein to synuclein phosphorylated at serine-129. According to a number of studies, these changes are typical of patients with PD. Unlike plasma, no change in the ratio of these proteins was found in lymphocytes. The coincidence of our data on the content of α -synuclein and its isoforms in the blood in Parkinsonian mice and the literature data on the content of α -synuclein in PD patients suggest that our PD model can be used for in-depth assessment of the peripheral manifestations of this disease, as well as for improvement of the differential diagnosis of PD, analysis of the effectiveness of the therapy used, and screening for new drugs.

Keywords: *Parkinson's disease, MPTP model, α -synuclein.*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 616.831:577.164.14:616.8-08

МОДУЛЯЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОГО БАЛАНСА В СТРУКТУРАХ МОЗГА ПРОИЗВОДНЫМИ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2021 г. Д. С. Семенович¹, Е. П. Лукиенко¹, Н. П. Канунникова^{2, *}

¹Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Беларусь

²Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

Поступила в редакцию 03.08.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята к публикации 25.10.2020 г.

Проведено исследование изменений показателей свободнорадикального окисления и тиол-дисульфидного статуса в структурах головного мозга в экспериментальной модели болезни Паркинсона (БП) на крысах, осуществляемой посредством введения животным ротенона. В качестве нейромодуляторов использовали производные пантотеновой кислоты — пантенол (ПЛ), пантетин (ПТ) и гомопантотеновую кислоту (ГПК). Установлено, что нарушения окислительно-восстановительного баланса в мозге при действии ротенона сопровождаются не только активацией свободнорадикальных процессов, но и выраженным угнетением антиоксидантной защиты, проявляющимся в уменьшении общей антиоксидантной активности, значительном снижении восстановительного потенциала системы глутатиона и усилении глутатионилирования белков. Эти изменения проявляются в наибольшей степени в базальных ганглиях мозга. ПЛ и ПТ, но не ГПК уменьшают изменения свободнорадикального окисления и тиол-дисульфидного баланса в структурах мозга. Механизмы нейротекторного действия ПЛ и ПТ, осуществляемые во взаимосвязи с изменениями биосинтеза CoA на фоне экспериментального нейротоксикоза, очевидно, связаны с их способностью повышать восстановительный потенциал системы глутатиона и таким образом уменьшать проявления окислительного стресса.

Ключевые слова: экспериментальный нейротоксикоз, структуры мозга, болезнь Паркинсона, окислительный стресс, система глутатиона, тиол-дисульфидный баланс, S-глутатионилирование белков, пантенол, пантетин, гомопантотеновая кислота

DOI: 10.31857/S102781332101012X

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний среди людей старших возрастных групп. Симптомы БП развиваются вследствие селективной гибели DA-нейронов в черной субстанции среднего мозга, связанной с образованием избытка свободных радикалов и развитием окислительного стресса [1, 2]. Роль свободнорадикальных продуктов и окислительного стресса в процессах нейродегенерации, в частности при БП, изучена достаточно полно, тогда как исследование систем поддержания редокс-баланса начало привлекать внимание исследователей только в последние годы [3–7], особенно после обобщения данных о том, что применение различ-

ных антиоксидантов с целью связывания избытка свободных радикалов в нервной ткани показало высокую эффективность в условиях эксперимента, но выявило недостаточную эффективность антиоксидантной терапии в условиях клиники. Исходя из этого, изучение изменений антиоксидантной защиты и тиол-дисульфидного баланса при БП и других видах нейродегенеративных нарушений приобретает все большую актуальность.

Доказательством важной роли восстановительного потенциала системы глутатиона в развитии окислительного стресса в мозге является уменьшение содержания GSH в посмертных образцах ткани мозга пациентов с БП по сравнению с тканью мозга пациентов без неврологической симптоматики [8]. Активация систем антиоксидантной защиты, которая сопровождается повышением уровня GSH, защищает DA-нейроны от гибели [9]. Установлены нарушения системы ре-

* Адресат для корреспонденции: 230012 Беларусь, Гродно, БЛК, 50; e-mail: n.kanunnikova@grsu.by.

докс потенциала системы глутатиона в экспериментальной модели БП на крысах, вызванной введением ротенона [10].

Маркерами окислительного стресса, которые наиболее часто обнаруживаются в посмертных экстрактах тканей пациентов с БП, являются белковые карбонилы, аддукты липоперекисления, продукты окисления ДНК [11]. Однако до сих пор не совсем ясно, являются ли эти изменения причиной или следствием нарушения функций белков и клеточных процессов. К настоящему времени накоплено много доказательств в пользу того, что ковалентные модификации цистеиновых остатков могут более эффективно влиять на повреждения тканей при окислительном стрессе при нейродегенеративных патологиях человека, чем реакции, связанные со свободными радикалами [12]. Реакции глутатионилирования/деглутатионилирования регулируются за счет экспрессии и активности глутаредоксина (Grx) и доступности субстрата GSH, который необходим для химического восстановления Grx.

Исходя из этого, мы провели исследование изменений показателей свободнорадикального окисления и тиол-дисульфидного статуса в структурах головного мозга в экспериментальной модели БП на крысах, осуществляемой посредством введения животным ротенона. В качестве нейромодуляторов использовали производные пантотеновой кислоты, которые проявили нейропротекторную активность в моделях алюминиевого нейротоксикоза, ишемии-реперфузии мозга и других [13].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные модели были выполнены на самках крыс линии Wistar CRL: (WI) WUBR массой 180–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария в соответствии с существующими нормами содержания лабораторных животных.

Ротенон (Р) вводили ежедневно в течение 6 нед. (2.5 мг/мг, подкожно, растворитель – смесь DMSO с подсолнечным маслом) [14]. С 5 нед. эксперимента на протяжении 14 дней ежедневно вводили производные пантотеновой кислоты (200 мг/кг, внутривенно) – D-пантенол (ПЛ), D-пантетин (ПТ) и гомопантотенат кальция (ГПК). Крысам контрольной группы вводили раствор DMSO в подсолнечном масле. На 43-й день эксперимента крыс декапитировали, извлекали головной мозг и репарировали на холоде, выделяя базальные ганглии, большие полушария и гиппокамп. Ткани помещали в жидкий азот и хранили при температуре -82°C .

Окислительный стресс оценивали по общей антиоксидантной активности (ОАА), определяемой по восстановлению катион-радикалов 2,2'-азино-бис-(3-этил-бензотиазолилсульфоновой

кислоты) [15], количеству общих гидропероксидов, измеряемых колориметрическим методом с применением ксиленолового оранжевого [16]. При определении конечных продуктов перекисного окисления липидов использовали методические указания [17, 18], которые позволяют выявлять содержание свободных и белковосвязанных тиобарбитурат-реагирующих соединений (ТБКРС), а также спонтанный и железоаскорбат-индуцированный уровни ТБКРС.

Для определения содержания белковых тиолов (PSH) и дисульфидов (PSSP) в гомогенате ткани использовали спектрофотометрический метод с использованием реактива Элмана [19, 20].

Содержание общего, восстановленного и окисленного глутатиона определяли ферментативным рециклическим методом с использованием глутатионредуктазы [21, 22]. Активность глутатионпероксидазы (GPx, КФ 1.11.1.9), глутатион-S-трансферазы (GST, КФ 2.5.1.18) и глутатионредуктазы (GR, КФ 1.6.4.2) определяли кинетическими спектрофотометрическими методами [23–25] соответственно. Содержание S-глутатионилированных белков определяли спектрофлуориметрическим методом [26].

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием программ Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 6.0. Экспериментальные данные представляли в виде $M \pm SEM$, где M – среднее значение, SEM – стандартная ошибка среднего. Достоверность межгрупповых различий оценивали используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением теста Тьюки. Во всех случаях статистически значимыми считали различия при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длительное введение крысам ротенона привело к активации ПОЛ, о чем свидетельствует повышение содержания всех изученных нами фракций ТБКРС в структурах мозга (табл. 1). Наиболее выраженное повышение содержания ТБКРС отмечалось в базальных ганглиях: белковосвязанных форм ТБКРС на 41%, спонтанного уровня ТБКРС на 31% и Fe/аскорбат-индуцированного уровня на 28% ($p < 0.05$), тогда как в гиппокампе содержание всех форм ТБКРС повысилось на 35–34–16–46%, в больших полушариях – на 17–16–9–28% соответственно. Это подтверждает данные литературы о преимущественном повреждающем действии ротенона на базальные ганглии [1, 14]. ПЛ и ПТ способствовали достоверному снижению содержания всех форм ТБКРС до уровня контроля во всех структурах мозга. Введение ГПК крысам на фоне ротенона не привело к

Таблица 1. Содержание ТБКРС в структурах мозга при введении ротенона (2.5 мг/кг, п/к, 6 нед.) и производных пантотеновой кислоты (200 мг/кг, в/ж, 5–6 нед. эксперимента), ($M \pm SEM$, $n = 8$)

Группы	ТБКРС, нмоль/мг белка			
	свободные	белковосвязанные	спонтанный уровень	Fe ²⁺ /аскорбат-индуцированный уровень
Большие полушария				
Контроль	0.576 ± 0.027	8.552 ± 0.039	5.124 ± 0.036	14.12 ± 0.28
Р	0.776 ± 0.025*	11.446 ± 0.042*	5.920 ± 0.035*	20.56 ± 0.34*
Р + ПЛ	0.520 ± 0.031*#	8.439 ± 0.044#	5.226 ± 0.033#	17.08 ± 0.29*#
Р + ПТ	0.626 ± 0.045*	8.135 ± 0.044#	5.304 ± 0.030#	17.89 ± 0.30*#
Р + ГПК	0.750 ± 0.042*	11.562 ± 0.040*	5.945 ± 0.042*	19.56 ± 0.32*
Базальные ганглии				
Контроль	0.582 ± 0.012	8.492 ± 0.038	4.540 ± 0.030	16.08 ± 0.32
Р	0.942 ± 0.013*	14.370 ± 0.037*	6.748 ± 0.023*	22.47 ± 0.30*
Р + ПЛ	0.704 ± 0.015*#	9.274 ± 0.028*#	5.298 ± 0.020*#	19.87 ± 0.54*#
Р + ПТ	0.768 ± 0.019*#	8.362 ± 0.025#	5.522 ± 0.020*#	20.92 ± 0.42*
Р + ГПК	0.904 ± 0.015*	13.994 ± 0.040*	6.650 ± 0.029*	21.32 ± 0.65*
Гиппокамп				
Контроль	0.508 ± 0.012	7.752 ± 0.022	4.792 ± 0.024	15.32 ± 0.24
Р	0.596 ± 0.013*	8.984 ± 0.020*	5.229 ± 0.023*	19.69 ± 0.30*
Р + ПЛ	0.495 ± 0.012#	8.865 ± 0.030*	5.122 ± 0.020*	17.08 ± 0.30*#
Р + ПТ	0.556 ± 0.032	8.921 ± 0.021*	5.168 ± 0.030*	18.86 ± 0.52*
Р + ГПК	0.605 ± 0.020*	8.919 ± 0.020*	5.246 ± 0.031*	20.11 ± 0.31*

Примечание: * $p < 0.05$ по отношению к контролю, # $p < 0.05$ по отношению к ротенону.

заметным изменениям содержания всех изученных форм ТБКРС.

Подтверждением наличия окислительного стресса при действии ротенона явилось повышение содержания общих гидропероксидов и снижение ОАА в структурах мозга крыс (табл. 2). Наиболее выраженные изменения также были отмечены в базальных ганглиях, где наблюдалось увеличение гидропероксидов на 28% и снижение ОАА на 16%, в то время как содержание гидропероксидов повысилось на 22 и 18%, ОАА снизилась на 8 и 5% в гиппокампе и больших полушариях соответственно. Введение животным ПТ и ПЛ на фоне ротенона способствовало нормализации данных показателей, тогда как влияние ГПК было значительно слабее.

Изучение изменений системы глутатиона показало, что введение ротенона сопровождалось снижением содержания GSH на 24%, повышением уровня GSSG на 11% и снижением соотношения GSH/GSSG на 32% в базальных ганглиях (табл. 3). В гиппокампе уровень GSH и соотношение GSH/GSSG снизились на 10 и 20%, а содержание GSSG повысилось на 14%. В больших полушариях содержание GSH при этом снизилось

лишь на 5% и соотношение GSH/GSSG – на 8% при отсутствии изменений уровня GSSG. Введение ПЛ и ПТ на фоне ротенона способствовало восстановлению уровня GSH и GSSG, а также соотношения GSH/GSSG в базальных ганглиях и других изученных структурах мозга. Действие ГПК было более слабым.

Введение ротенона способствовало увеличению активности глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы в структурах мозга (табл. 4). В базальных ганглиях эти изменения были более выраженными, чем в других структурах: активность GST повысилась на 15%, GPx – на 20%, GR – на 30% ($p < 0.05$) выше значений в контрольной группе ($p < 0.05$). Введение животным предшественников биосинтеза КоА ПЛ и ПТ приводило к снижению активности данных ферментов, не достигшему, однако, уровня контроля. ГПК практически не оказал влияния на их активность.

В отношении белковых тиолов и дисульфидов воздействие ротенона также было более выраженным в базальных ганглиях, где наблюдалось снижение содержания PSN на 19% и увеличение содержания PSSP на 30% со снижением соотно-

Таблица 2. Содержание общих гидропероксидов и общая антиоксидантная активность в структурах мозга при хроническом введении ротенона (2.5 мг/кг, п/к, 6 нед.) и производных пантотеновой кислоты (200 мг/кг, в/ж, 5–6 нед. эксперимента), ($M \pm SEM$, $n = 8$)

Группы	ROOH, нмоль/мг белка	OAA, нмоль экв. GSH/мг белка
Большие полушария		
Контроль	22.36 $\pm$ 0.61	81.42 $\pm$ 2.70
P	27.35 $\pm$ 0.58*	75.12 $\pm$ 2.32*
P + ПЛ	24.29 $\pm$ 0.45*#	78.62 $\pm$ 2.29*#
P + ПТ	25.16 $\pm$ 0.44*#	75.12 $\pm$ 2.24*
P + ГПК	28.11 $\pm$ 0.60*	75.87 $\pm$ 2.52*
Базальные ганглии		
Контроль	28.78 $\pm$ 0.36	86.55 $\pm$ 2.40
P	39.72 $\pm$ 0.40*	73.12 $\pm$ 2.46*
P + ПЛ	33.43 $\pm$ 0.38*#	82.88 $\pm$ 2.39*#
P + ПТ	32.57 $\pm$ 0.30*#	79.10 $\pm$ 2.38*#
P + ГПК	40.21 $\pm$ 0.52*	75.41 $\pm$ 2.37*
Гиппокамп		
Контроль	28.23 $\pm$ 0.32	82.10 $\pm$ 2.12
P	33.42 $\pm$ 0.30*	78.29 $\pm$ 2.23*
P + ПЛ	33.12 $\pm$ 0.31*	78.65 $\pm$ 2.24*
P + ПТ	33.89 $\pm$ 0.31*	77.05 $\pm$ 2.21*
P + ГПК	34.92 $\pm$ 0.68*	78.49 $\pm$ 2.62*

Примечание: * $p < 0.05$ по отношению к контролю, # $p < 0.05$ по отношению к ротенону.

шения PSH/PSSP на 42%, тогда как в больших полушариях и гиппокампе эти показатели изменились на 10–25–30% и 3–18–20% соответственно (табл. 5). Обращает на себя внимание тот факт, что если в базальных ганглиях нормализующее действие на уровень белковых тиолов и дисульфидов оказали только ПЛ и ПТ, то в больших полушариях и гиппокампе показатели белкового тиол-дисульфидного баланса возвратились к контрольным значениям при действии всех изученных нами производных пантотеновой кислоты.

Изменения в системе глутатиона и белковых тиолов и дисульфидов при действии ротенона сопровождались повышением содержания S-глутатионилированных белков на 36% в базальных ганглиях и на 18–19% соответственно в больших полушариях и гиппокампе (табл. 5). Действие ПЛ и ПТ привело к ослаблению эффекта ротенона на данный показатель, тогда как ГПК практически не оказал влияния во всех структурах мозга.

ОБСУЖДЕНИЕ

Воздействие ротенона — ингибитора комплекса I электронтранспортной цепи митохондрий — при-

водит к развитию окислительного стресса в структурах мозга, причем наиболее выражено это проявляется в базальных ганглиях [3, 7]. Так, именно в этой структуре мозга, по нашим данным, отмечается повышение активности ПОЛ и снижение общей антиоксидантной активности что свидетельствует о значительном повышении процессов образования свободных радикалов и угнетении систем антиоксидантной защиты. Снижение уровня восстановленного глутатиона, повлекшее снижение соотношения GSH/GSSG, уменьшение содержания белковых тиолов и повышение уровня S-глутатионилированных белков в этой структуре мозга, активацию GST, очевидно, являются следствием активного участия системы глутатиона в поддержании окислительно-восстановительного баланса на фоне действия ротенона [27]. Это подтверждается данными корреляционного анализа, показавшего наличие тесной взаимосвязи между снижением редокс-соотношения глутатиона и повышением уровня его дисульфидной формы ($r = -0.8762$, $p < 0.05$) при действии ротенона.

Об участии пантотеновой кислоты в поддержании тиольного и иммунного баланса в разных тканях указывалось в работе [28]. Нейропротекторное действие производных пантотеновой кислоты было установлено при ишемии головного мозга [29, 30], в алюминиевой модели нейродегенерации [13], а совсем недавно [31] появились сведения о важной роли пантотената и пантетина в процессах миелинизации в нервной ткани. Нами показано, что ПЛ и ПТ способствуют уменьшению проявлений окислительного стресса, повышению соотношения GSH/GSSG, снижению уровня S-глутатионилированных белков во всех структурах мозга при действии ротенона. Наиболее выраженное влияние данных препаратов наблюдается в базальных ганглиях. При этом наблюдается тесная взаимосвязь между возвращениями соотношения GSH/GSSG к контрольным значениям не только с изменениями уровня дисульфидной формы глутатиона ($r = -0.8333$, $p < 0.05$), но и общей антиоксидантной активности ($r = -0.5476$, $p < 0.05$), что подтверждает наличие прямого антиоксидантного действия ПЛ и ПТ через систему глутатиона. Выявленная положительная корреляция между активностью глутатионпероксидазы и редокс-соотношением глутатиона ($r = 0.6190$, $p < 0.05$) дает основание полагать, что протекторное действие ПЛ при ротеноновом нейротоксикозе реализуется преимущественно через изменения активности глутатионпероксидазы.

Механизмы нейропротекторного действия ПЛ и ПТ на фоне экспериментального нейротоксикоза, по-видимому, связаны с их способностью повышать восстановительный потенциал системы глутатиона и таким образом уменьшать проявления окислительного стресса и осуществляются в значительной степени во взаимосвязи с

Таблица 3. Содержание восстановленного и окисленного глутатиона в структурах мозга при хроническом введении ротенона (2.5 мг/кг, п/к, 6 нед.) и производных пантотеновой кислоты (200 мг/кг, в/ж, 5–6 нед. эксперимента), ($M \pm SEM$, $n = 8$)

Группы	GSH, нмоль/мг белка	GSSG, нмоль/мг белка	GSH/GSSG
Большие полушария			
Контроль	18.26 $\pm$ 0.41	0.115 $\pm$ 0.004	160.78 $\pm$ 4.2
P	17.42 $\pm$ 0.36*	0.121 $\pm$ 0.005	146.53 $\pm$ 3.9*
P + ПЛ	18.52 $\pm$ 0.44	0.111 $\pm$ 0.004	164.12 $\pm$ 3.7#
P + ПТ	18.39 $\pm$ 0.41	0.108 $\pm$ 0.006	168.67 $\pm$ 4.1#
P + ГПК	18.12 $\pm$ 0.39	0.117 $\pm$ 0.005	156.87 $\pm$ 4.8#
Базальные ганглии			
Контроль	25.87 $\pm$ 0.51	0.110 $\pm$ 0.004	236.34 $\pm$ 3.8
P	19.54 $\pm$ 0.49*	0.124 $\pm$ 0.005*	160.58 $\pm$ 4.3*
P + ПЛ	22.89 $\pm$ 0.46*#	0.116 $\pm$ 0.004#	194.73 $\pm$ 5.1*#
P + ПТ	21.76 $\pm$ 0.48*#	0.114 $\pm$ 0.005#	193.88 $\pm$ 4.5*#
P + ГПК	20.15 $\pm$ 0.52*	0.112 $\pm$ 0.006#	180.91 $\pm$ 3.9*#
Гиппокамп			
Контроль	21.35 $\pm$ 0.38	0.107 $\pm$ 0.003	198.68 $\pm$ 3.9
P	19.12 $\pm$ 0.40*	0.122 $\pm$ 0.005*	158.72 $\pm$ 4.6*
P + ПЛ	21.52 $\pm$ 0.41	0.100 $\pm$ 0.004#	214.50 $\pm$ 3.8*#
P + ПТ	21.69 $\pm$ 0.39	0.098 $\pm$ 0.005#	218.38 $\pm$ 3.7*#
P + ГПК	21.41 $\pm$ 0.42	0.104 $\pm$ 0.003#	210.84 $\pm$ 4.2*#

Примечание: * $p < 0.05$ по отношению к контролю, # $p < 0.05$ по отношению к ротенону.**Таблица 4.** Активность ферментов окислительно-восстановительных превращений глутатиона в структурах мозга крыс при хроническом введении ротенона (2.5 мг/кг, п/к, 6 нед.) и производных пантотеновой кислоты (200 мг/кг, в/ж, 5–6 нед. эксперимента), ($M \pm SEM$, $n = 8$)

Группы	GR, нмоль GSH/мин/мг белка	GST, нмоль GSH-CDNB конъюгатов /мин/мг белка	GPx (t-BHP), нмоль NADHP/мин/мг белка
Большие полушария			
Контроль	36.21 $\pm$ 0.29	65.11 $\pm$ 0.41	28.96 $\pm$ 0.32
P	40.34 $\pm$ 0.27*	70.36 $\pm$ 0.46*	32.01 $\pm$ 0.28*
P + ПЛ	37.16 $\pm$ 0.26*#	68.27 $\pm$ 0.39#	31.25 $\pm$ 0.30#
P + ПТ	37.26 $\pm$ 0.28*#	67.79 $\pm$ 0.42#	30.65 $\pm$ 0.29#
P + ГПК	39.98 $\pm$ 0.30*	71.12 $\pm$ 0.42*	32.36 $\pm$ 0.33*
Базальные ганглии			
Контроль	30.19 $\pm$ 0.33	59.73 $\pm$ 0.45	32.63 $\pm$ 0.29
P	39.65 $\pm$ 0.30*	70.36 $\pm$ 0.49*	39.23 $\pm$ 0.28*
P + ПЛ	35.16 $\pm$ 0.31*#	64.36 $\pm$ 0.48*#	33.21 $\pm$ 0.26#
P + ПТ	34.72 $\pm$ 0.29*#	61.83 $\pm$ 0.41*#	31.96 $\pm$ 0.28#
P + ГПК	39.33 $\pm$ 0.31*	68.17 $\pm$ 0.46*	40.10 $\pm$ 0.32*
Гиппокамп			
Контроль	31.63 $\pm$ 0.30	61.31 $\pm$ 0.42	31.42 $\pm$ 0.30
P	35.87 $\pm$ 0.34*	68.25 $\pm$ 0.44*	36.61 $\pm$ 0.31*
P + ПЛ	34.12 $\pm$ 0.28*#	65.12 $\pm$ 0.40*#	33.65 $\pm$ 0.29*#
P + ПТ	33.26 $\pm$ 0.28*#	64.52 $\pm$ 0.41*#	33.12 $\pm$ 0.30*#
P + ГПК	35.61 $\pm$ 0.36*	69.32 $\pm$ 0.44*	36.42 $\pm$ 0.33*

Примечание: * $p < 0.05$ по отношению к контролю, # $p < 0.05$ по отношению к ротенону.

Таблица 5. Содержание белковых тиолов и дисульфидов, глутатионилированных белков в структурах мозга при хроническом введении ротенона (2.5 мг/кг, п/к, 6 нед.) и производных пантотеновой кислоты (200 мг/кг, в/ж, 5–6 нед. эксперимента), ($M \pm SEM$, $n = 8$)

Группы	PSH, мкмоль/г ткани	PSSP, мкмоль/г ткани	PSH/PSSP	PSSG, нмоль/мг белка
Большие полушария				
Контроль	10.12 $\pm$ 0.78	4.12 $\pm$ 0.51	2.64 $\pm$ 0.41	0.495 $\pm$ 0.015
P	9.16 $\pm$ 0.56*	5.17 $\pm$ 0.60*	1.83 $\pm$ 0.49*	0.592 $\pm$ 0.018*
P + ПЛ	10.28 $\pm$ 0.68#	4.21 $\pm$ 0.62#	2.53 $\pm$ 0.53#	0.515 $\pm$ 0.016#
P + ПТ	10.06 $\pm$ 0.72#	4.38 $\pm$ 0.64#	2.41 $\pm$ 0.55#	0.506 $\pm$ 0.015#
P + ГПК	10.34 $\pm$ 0.70#	4.05 $\pm$ 0.52#	2.58 $\pm$ 0.60#	0.531 $\pm$ 0.014*
Базальные ганглии				
Контроль	10.66 $\pm$ 0.64	4.23 $\pm$ 0.48	2.62 $\pm$ 0.51	0.567 $\pm$ 0.019
P	8.65 $\pm$ 0.69*	6.05 $\pm$ 0.56*	1.53 $\pm$ 0.64*	0.884 $\pm$ 0.025*
P + ПЛ	10.21 $\pm$ 0.67#	4.48 $\pm$ 0.52#	2.36 $\pm$ 0.59#	0.724 $\pm$ 0.021*#
P + ПТ	9.84 $\pm$ 0.55*	4.33 $\pm$ 0.45#	2.21 $\pm$ 0.45#	0.689 $\pm$ 0.020*#
P + ГПК	8.59 $\pm$ 0.72*	5.19 $\pm$ 0.59#	1.55 $\pm$ 0.41*	0.898 $\pm$ 0.026*#
Гиппокамп				
Контроль	10.33 $\pm$ 0.54	4.10 $\pm$ 0.42	2.61 $\pm$ 0.63	0.511 $\pm$ 0.028
P	9.98 $\pm$ 0.45*	4.86 $\pm$ 0.43	2.08 $\pm$ 0.51*	0.603 $\pm$ 0.016*
P + ПЛ	10.42 $\pm$ 0.60	4.01 $\pm$ 0.50	2.58 $\pm$ 0.43	0.523 $\pm$ 0.011#
P + ПТ	10.51 $\pm$ 0.52	4.21 $\pm$ 0.51	2.51 $\pm$ 0.55	0.509 $\pm$ 0.012#
P + ГПК	10.39 $\pm$ 0.54	4.12 $\pm$ 0.52	2.64 $\pm$ 0.60	0.610 $\pm$ 0.020*

Примечание: * $p < 0.05$ по отношению к контролю, # $p < 0.05$ по отношению к ротенону.

изменениями биосинтеза CoA [13]. Об этом свидетельствует защитное действие ПЛ и ПТ, которые являются предшественниками биосинтеза CoA, тогда как ГПК, производное пантотеновой кислоты, в которой β -аланиновый остаток замещен на ГАМК, и она не может превращаться в CoA, такого влияния не оказывает. В то же время ГПК успешно восстанавливает белковый тиол-дисульфидный баланс не только в базальных ганглиях, но и в больших полушариях и гиппокампе. Это может быть связано с эффектами ГПК как соединения с выраженной нейротропной активностью, осуществляемой не столько через модуляцию окислительно-восстановительного баланса, сколько через воздействие на нейромедиаторные системы мозга, в частности через воздействие на ГАМК-рецепторы [32].

БП сопровождаются не только активацией ПОЛ, но и выраженным угнетением антиоксидантной защиты, проявляющимся в уменьшении общей антиоксидантной активности, значительном снижении восстановительного потенциала системы глутатиона. Эти изменения при действии ротенона проявляются в наибольшей степени в базальных ганглиях мозга. Механизмы нейропротекторного действия ПЛ и ПТ, осуществляемые во взаимосвязи с изменениями биосинтеза CoA на фоне экспериментального нейротоксикоза, очевидно, связаны с их способностью повышать восстановительный потенциал системы глутатиона и таким образом уменьшать проявления окислительного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушения окислительно-восстановительного баланса в мозге в экспериментальной модели

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта 1.64 ГПНИ Республики Беларусь “Биотехнологии”, 2016–2020 гг.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все эксперименты с лабораторными животными выполнялись в соответствии с этическими нормами, а также правилами проведения научных работ с использованием экспериментальных животных в научных исследованиях, составленными на основании Директивы 2010/63/EU и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22.09.2010 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller R.L., James-Kracke M., Sun G.Y., Sun A.Y. // *Neurochem. Res.* 2009. Т. 34. С. 55–65.
2. Sofic E., Lange K.W., Jellinger K., Riederer P. // *Neurosci. Lett.* 1992. V. 142. P. 128–130.
3. Gu F., Chauhan V. // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2015. V. 18. P. 89–95.
4. Aoyama K., Nakaki T. // *Internat. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 10. P. 21021–21044.
5. McBean G.J., Mutay Aslan, Griffiths H.R., Torrão R.C. // *Redox Biol.* 2015. V. 5. P. 186–194.
6. McBean G.L., López M.G., Wallner F.K. // *British J. Pharm.* 2017. V. 174. P. 1750–1770.
7. Gitler A.D., Dhillon P., Shorter J. // *Dis. Models Mech.* 2017. V. 10. P. 499–502.
<https://doi.org/10.1242/dmm.030205>
8. Johnson W.M., Wilson-Delfosse A.L., Mieyal J.J. // *Nutrients.* 2012. V. 4. P. 1399–1440.
9. Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. № 16. P. 4904–4911.
10. Bashun N., Kanunnikova N., Semenov D.S., Raduta E., Lis R. // *German Science Herald.* 2017. № 1. P. 13–18.
11. Chung K.K., Dawson V.L., Dawson T.M. // *Methods Enzymol.* 2005. V. 396. P. 139–150.
12. Melo A., Monteiro L., Lima R.M.F., de Oliveira D.M., de Cerqueira M.D., El-Bachá R.S. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011. V. 2011. P. 467180.
13. Семенович Д.С., Канунникова Н.П., Мойсеёнок А.Г. // Докл. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. 2020. Т. 64. № 1. С. 78–85.
14. Zhang Z.N., Zhang J.S., Xiang J., Yu Zh.H., Zhang W., Cai M., Li X.T., Wu T., Li W.W., Cai D.F. // *Brain Res.* 2017. № 1655. P. 104–113.
15. Erel O. // *Clin. Biochem.* 2004. V. 37. P. 277–285.
16. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. // *Free Rad. Biol. Med.* 1995. V. 19. № 3. P. 271–280.
17. Mihara M., Uchiyama M. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. № 1. P. 271–278.
18. Durfinova M., Brechitlova M., Liska B., Baroskova Z. // *Chemical Papers.* 2007. V. 61. № 4. P. 321–325.
19. Robyt J.F., Ackerman R.J., Chittenden C.G. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1971. V. 147. P. 262–269.
20. Patsoukis N., Georgiou C.D. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. P. 1783–1792.
21. Anderson M.E. // *Methods Enzymol.* 1985. V. 113. P. 548–555.
22. Rahman I., Kode A., Biswas S.K. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 6. P. 3159–3165.
23. Flohé L., Günzler W.A. // *Methods Enzymol.* 1984. V. 105. P. 114–121.
24. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 22. P. 7130–7139.
25. Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 175. P. 408–413.
26. Menon D., Board P.G. // *Anal. Biochem.* 2013. V. 433. P. 132–136.
27. Garrido M., Tereshchenko Y., Zhevtsova Z., Taschenberger G. // *Acta Neuropathol.* 2011. V. 121. P. 475–485.
28. Moiseenok A.G., Komar V.I., Khomich T.I., Kanunnikova N.P., Slyshenkov V.S. // *Biofactors.* 2000. V. 1. P. 53–55.
29. Onufriev M.V., Stepanichev M.Yu., Lazareva N.V., Katkovskaya I.N., Tishkina A.O., Moiseenok A.G., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2010. V. 4(2). P. 148–152.
30. Kanunnikova N.P., Bashun N.Z., Moiseenok A.G. // *Lipid Peroxidation.* Intechopen, 2012. V. 23. P. 492–513.
31. Ismail N., Kureishy N., Church S., Scholefield M., Unwin R.D., Xu J., Patassini S., Cooper G.J.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 522. № 1. P. 220–225.
32. Канунникова Н.П., Семенович Д.С., Гуринович В.А., Мойсеенок А.Г. // Биохимия и молекулярная биология. Вып. 3. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии. Сб. науч. трудов. Минск: ИВЦ Минфина, 2019. С. 64–67.

Modulation of Oxidative Stress and Thiol-Disulfide Balance Parameters in the Brain Structures by Pantothenic Acid Derivatives in Parkinson's Disease Experimental Model

D. S. Semenovich^a, E. P. Lukiyenko^a, and N. P. Kanunnikova^b

^aInstitute of Biochemistry of Biologically Active Substances, NAS of Belarus, Grodno, Belarus

^bYanka Kupala's Grodno State University, Grodno, Belarus

Parkinson's disease (PD), one of the most common neurodegenerative diseases among people of older age groups, requires long-term maintenance therapy, which makes the search for new means of its metabolic therapy especially urgent. We studied the effect of pantothenic acid derivatives - panthenol (PL), pantethine

(PT), and homopantothenic acid (HPA) on changes in the indices of free radical oxidation and thiol-disulfide status in the brain structures in a rotenone-induced PD model in rats. It was found that the action of rotenone is accompanied not only by the activation of free radical processes but also by a pronounced suppression of antioxidant protection, which manifests itself in a decrease in the total antioxidant activity, a significant decrease in the reducing potential of the glutathione system and an increase in glutathionylation of proteins. These changes are most pronounced in the basal ganglia of the brain. PL and PT but not HPA diminish changes in free radical oxidation and thiol-disulfide balance in brain structures. The mechanisms of the neuroprotective action of PL and PT, which act in parallel with changes in CoA biosynthesis during experimental neurotoxicosis, are apparently associated with their ability to increase the reduction potential of the glutathione system and thus decrease the manifestations of oxidative stress.

Keywords: experimental neurotoxicosis, brain structures, Parkinson's disease, oxidative stress, glutathione system, thiol-disulfide balance, S-glutathionylation of proteins, panthenol, pantethine, homopantothenic acid

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 616.831-06:616.831-005]-018.83-085-092.9

ФАРМАКОКОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОГО РАВНОВЕСИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ФОРМОЙ АНТАГОНИСТА IL-1b ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

© 2021 г. И. Ф. Беленичев¹ *, Б. С. Бурлака¹, Н. В. Бухтиярова¹, Е. Г. Алиева¹,
Э. В. Супрун², А. М. Ищенко³, А. С. Симбирцев³

¹Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

²Харьковская медицинская академия последипломного образования, Харьков, Украина

³ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 09.06.2020 г.

После доработки 07.12.2020 г.

Принята к публикации 14.12.2020 г.

Проведено исследование влияния геля РАИЛ (антагонист IL-1b) при интраназальном применении у крыс с экспериментальной хронической церебральной ишемией, вызванной необратимой окклюзией общих сонных артерий на основные показатели тиол-дисульфидной системы и экспрессию белка теплового шока (HSP₇₀) в головном мозге. Установлено, что при моделировании хронической церебральной ишемии происходит нарушение тиол-дисульфидной системы – снижения активности ГПР, GST и ГР, дефицит восстановленных тиолов, GSH, снижение содержания цистеина и метионина на фоне увеличения окисленной формы глутатиона в головном мозге животных. Параллельно регистрировали повышение содержания маркера нитрозативного стресса-нитротирозина, снижение концентрации эндогенного цитопротектора – HSP₇₀. Интраназальное введение в течение 18 суток РАИЛа приводило к увеличению на 58.2% восстановленных интермедиатов тиол-дисульфидной системы (SH-группы) и повышению на 100% уровня GSH, на фоне снижения содержания его окисленной формы на 36.3% по сравнению с контролем. РАИЛ повышал активность ГР на 96.1%, ГПР на 68.1%, а GST на 137.7% относительно показателей контроля. При курсовом интраназальном введении геля РАИЛа концентрация белка HSP₇₀ в цитозоле гомогената головного мозга животных повышалась на 98.4%, а в митохондриях на 142.8% раз по сравнению с показателями контроля. Применение РАИЛа демонстрирует нейропротективный эффект, направленный на стабилизацию тиол-дисульфидного равновесия и активацию HSP₇₀-зависимых механизмов эндогенной нейропротекции.

Ключевые слова: хроническая церебральная ишемия, тиол-дисульфидная система, HSP₇₀, нейропротекция, антагонист IL-1b(РАИЛ), интраназальный гель

DOI: 10.31857/S1027813321010155

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ:

HIF-1a – фактор, индуцируемый гипоксией
1-альфа (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)

HSP₇₀ – белок теплового шока 70 кДа (70 kilodalton heat shock proteins)

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

nNOS – нейрональная синтаза оксида азота

АФК – активные формы кислорода

ГПР – глутатионпероксидаза

GST- глутатионтрансфераза

ГР – глутатионредуктаза

ТДС – тиол-дисульфидная система

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

ХЦИ – хроническая церебральная ишемия

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи современной медицины, проблема нарушений мозгового кровообращения продолжает оставаться актуальной. В последнее десятилетие в промышленно развитых странах регистрируется постоянное увеличение cerebrovasкулярных заболеваний, особенно, ишемического инсульта [1–5]. С 90-х годов про-

* Адресат для корреспонденции: 69035, Украина, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26; тел.: +38 (0612) 34-27-41; e-mail: ifb1914@mail.ru

шлого столетия в комплексной терапии НМК применяются первичные и вторичные нейропротекторы (модуляторы NMDA, блокаторы Ca^{2+} , ноотропы, антиоксиданты и т.д.). Однако большинство из них не дают ожидаемого нейропротективного эффекта. Поэтому актуальным является изучение тонких молекулярно-биохимических механизмов повреждений головного мозга при НМК, поиск новых перспективных мишеней для таргетной нейропротекции [3]. Анализ динамики патогенетических механизмов, запускаемых ишемией мозга, установил их четкую временную последовательность. В течение первых 3 часов с момента ОНМК максимально представлен энергетический дефицит в ишемизированной ткани, через 3–6 ч развивается глутаматная “эксайтотоксичность”, нарушение кальциевого гомеостаза и лактат-ацидоз, которые угасают к концу первых суток. Отдаленные последствия ишемии, такие как оксидантный, нитрозативный стресс и локальное воспаление начинают проявляться через 2–3 ч, достигают максимума через 12–36 ч, а на 2–3 сут начинается нейроапоптоз [2–4, 6]. В ответ запускаются компенсаторные механизмы эндогенной нейропротекции среди которых особый интерес представляют белки теплового шока HSP₇₀ и тиол-дисульфидная система [7, 8]. Интермедиат ТДС глутатион является важным компонентом защиты нейрона, повышает его устойчивость к гипоксии, ограничивает гипервозбудимость NMDA, выступает в качестве резерва цистеина в клетке, регулирует синтез и стабильность HSP₇₀, участвует в NO- и IL-1b-зависимых механизмах апоптоза [2, 7–10]. В опытах *in vitro* выявлено, что депривация уровня GSH в нейронах приводит к падению HSP₇₀, а в условиях моделирования НМК выявлена корреляционная взаимосвязь между выраженностью неврологических нарушений и дефицитом GSH и HSP₇₀ в головном мозге животных [3, 6]. Среди механизмов вторичного повреждения головного мозга особое значение имеют реакции локального воспаления вокруг зоны “ядра” инфаркта, сопровождающие резким подъемом уровня провоспалительных цитокинов, в частности IL-1b [9, 11, 12]. При взаимодействии IL-1b с рецепторами активируются факторы ядерной транскрипции AP-1 и NF-κB, которые меняют поведение клеток-мишеней и приводят к развитию острофазного клеточного ответа, экспрессии других провоспалительных факторов, стимуляции астроцитами экспрессии iNOS и цитотоксических производных NO, повышению проницаемости митохондриальной поры и инициации нейроапоптоза [4, 6, 11]. Выявлена корреляционная взаимосвязь между повышением уровня провоспалительных цитокинов (IL-1b, TNF-α, IL-6, IL-8), степенью тяжести неврологических нарушений и дефицитом ростовых факторов (BDNF, IGF-1, PDGF). Сигнальный путь с

IL-1b, направленный на усиление отсроченных механизмов гибели нейронов после ОНМК может регулироваться HSP₇₀ [3]. Повышение концентрации HSP₇₀ в пределах физиологической нормы приводит к повышению IL-1β до уровня, необходимого для участия в цито- и нейропротекции, дефицит HSP₇₀ может повлечь значительную экспрессию IL-1. Сверхэкспрессия HSP₇₀ ослабляет экспрессию IL-1β за счет ингибирования факторов транскрипции C/EBPβ и C/EBPδ [1]. HSP₇₀ может предотвращать продукцию воспалительных цитокинов путем вмешательства в NF-κB-зависимую транскрипцию [6]. Известно, что повышенная продукция TNF-α, IL-1β, IL-6 и IL-8 происходит на фоне дефицита GSH [10]. GSH и его предшественник N-ацетилцистеин способны модулировать NF κB, снижать экспрессию IL-1β и проявлять противовоспалительное действие [9, 10, 12–15]. IL-1β в зависимости от концентрации может регулировать транспорт GSH и влиять на механизмы нейропротекции/нейродеструкции [1]. Рациональная нейропротекция предполагает прерывание каскадных механизмов гибели нейронов, что и определяет IL-1b как важную мишень фармакологического воздействия [3, 7, 13]. В настоящее время получены убедительные данные о нейропротективном действии антагониста IL-1b – РАИЛ [8]. Получены данные, что парентеральное введение РАИЛ животным с ОНМК приводит к снижению летальности, уменьшению неврологических нарушений, а также уменьшению зоны инфаркта мозга, повышение плотности нейронов сенсомоторной зоны и гиппокампа [11]. С целью уточнения механизма действия РАИЛ, с учетом известных взаимосвязей между экспрессией IL-1b, уровнем GSH и HSP₇₀, предоставляется интересным определить направленность и выраженность влияния этого антагониста IL-1b на показатели тиол-дисульфидной системы и концентрацию HSP₇₀ в условиях экспериментальной хронической церебральной ишемией. Интерес фармакологов и клиницистов представляет и новая лекарственная форма РАИЛ – гель для интраназального применения. Все это определяет актуальность настоящего исследования.

Цель настоящей работы – изучить влияние геля РАИЛ при интраназальном применении на показатели тиол-дисульфидной системы и концентрацию белка теплового шока 70 кДа в головном мозге крыс при хронической церебральной ишемии, вызванной необратимой окклюзией общих сонных артерий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 80 белых беспородных крысах массой 170–180 г, обоего пола, полученных из питомника ГУ “Институт фармакологии и

токсикологии АМН Украины”. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина. Клетки с животными были помещены в отдельные комнаты. Световой режим: 12 ч – свет, 12 ч – темнота. Температура воздуха поддерживалась в пределах 19–25°C, относительная влажность – 50–70%. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час. Опытных животных содержали на одинаковых рационах, в обычных условиях вивария [16, 17]. Животные помещались в стандартных клетках по 5 особей в клетке. Рацион питания – фуражное зерно, рыба, творог, хлеб, корнеплоды (свекла, морковь). Все манипуляции были проведены согласно положению об использовании животных в биомедицинских опытах (Страсбург, 1986г., с изменениями, внесенными в 1998г.). Протоколы экспериментальных исследований и их результаты утверждены решением Комиссии по биоэтике ЗГМУ (протокол № 32 от 26 октября 2018 г.). В работе использовали модель хронической церебральной ишемии, которую воспроизводили путем двухсторонней окклюзии общих сонных артерий у экспериментальных животных под наркозом (тиопентал натрия, 40 мг/кг). Стоит обратить внимание на то, что данная модель является травматичной, гибель животных особенно в первые часы довольно часто происходит вследствие ошибки экспериментаторов, которые перевязывают вместе с а. carotidis и n. vagus. Правильно выполненная операция по моделированию церебральной ишемии путем перевязки обеих общих сонных артерий по данным ряда исследований вызывает смертность на 1–20 сут 50–80% в зависимости от вида крыс [16, 17]. Учитывая высокую смертность для этой экспериментальной модели, оперировали такое количество животных, чтобы к 18 суткам в каждой группе было по 20 животных. Также была серия ложно-оперируемых животных, которым под наркозом, разрезалась кожа, под сонные артерии подводилась лигатура, но не производили окклюзию и затем кожа ушивалась. Животных всех групп выводили из эксперимента на 18-е сутки после операции под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Исследуемые препараты вводили по схеме: РАИЛ – интраназально в виде геля 1 раз в сутки в течение 18 дней (1 мг/кг), референс-препарат Цитиколин –

внутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 18 дней (500 мг/кг) [1]. Цитиколин одобрен и широко применяется более 30 лет в странах Западной Европы и США для лечения мозгового инсульта (ишемического и геморрагического) и ЧМТ. В работе использовался Цитиколин производства Ferrer Internacional, S.A. (Испания) и представленным Nycomed Austria, GmbH (Австрия).

В эксперименте животные были разделены на четыре группы:

- 1) ложнооперированные, получавшие в течение 18 сут основу геля интраназально – (20 крыс);
- 2) контрольные – животные с хронической церебральной ишемией (ХЦИ), получавшие в течение 18 сут основу геля интраназально (20 крыс);
- 3) животные с ХЦИ, получавшие гель РАИЛ интраназально в течение 18 сут (20 крыс);
- 4) животные с ХЦИ, получавшие Цитиколин парентерально в течение 18 сут (20 крыс).

В работе использовалась субстанция РАИЛ, полученная из Федерального государственного унитарного предприятия “Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биологических препаратов” (Россия, С.-Петербург, ЛСР-007452/1-0300710). Субстанция получена биотехнологически из *E. coli* TG1(pTAC-hIL-1ra), состоит из 153 аминокислот. М.м. 17.906 кДа. РАИЛ-гель (5мг/1 мл) разработан на кафедре технологии лекарственных средств ЗГМУ.

Биохимические методы исследования. Из головного мозга быстро удаляли кровь, отделяли от мозговой оболочки и исследуемые кусочки помещали в жидкий азот. Затем измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды при (2°C), содержащей (в ммольях): сахарозы – 250, трис-HCl-буфера – 20, ЭДТА -1 (рН 7.4) [2, 11]. При температуре (+4°C) методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Sigma 3-30k (Германия) разделяли цитозольную и митохондриальную фракции (17000 g). Супернатант сливали и хранили при –80°C. Состояние тиол-дисульфидных системы головного мозга оценивали по содержанию восстановленного глутатиона (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) в цитозольной фракции флуориметрически с использованием *o*-фталевого ангидрида на флуориметре Quantech [2]. Уровень свободных SH-групп, активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы в цитозольной фракции измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре Libra S 32 PC [13]. Содержание цистеина и метионина определяли методом тонкослойной хроматографии в цитозольной фракции с последующей спектрофотометрией на спектрофотометре Libra S 32 PC [17]. Общее содержание восстановленных и окисленных сульфгидрильных групп в цитозольной

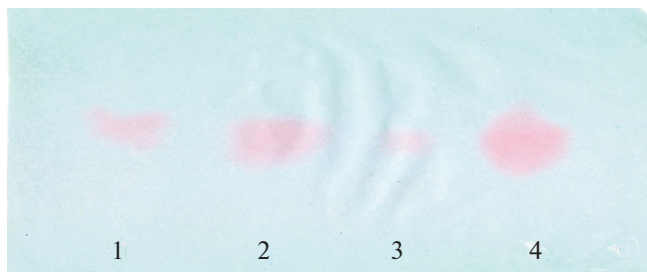


Рис. 1. Экспрессия белка HSP₇₀ в цитозоле головного мозга крыс (нитроцеллюлозная мембрана после обработки первичными и вторичными антителами, для визуализации использовали 3-амино-9-этилкарбазолом). 1 — животные с хронической церебральной ишемией (ХЦИ), получавшие Цитиколин; 2 — животные с ХЦИ, получавшие гель РАИЛ; 3 — животные с ХЦИ без лечения (контроль); 4 — ложнооперированные животные.

фракции определяли с помощью реактива Элмана спектрофотометрически на спектрофотометре Libra S 32 PC [17]. Концентрацию белка оценивали по методу Бредфорда.

Иммуноферментный анализ. Степень интенсивности нитрозативного стресса в головном мозге определяли по концентрации нитротирозина в цитозольной фракции методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) на полнопланшетном иммуноферментном анализаторе (SIRIOS, Италия) с применением тест-набора “Nitrotyrosine ELISAKit” (“Hy Cultbiotechnology”). Гомоцистеин определяли аналогичным методом с применением тест-набора (“Axis-Shield”).

Вестерн-блоттинг. Концентрацию в цитоплазматической и митохондриальной фракциях головного мозга HSP₇₀ определяли методом Вестерн-блот анализа (рис. 1). Белки разделяли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) путем электрофореза. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану ее помещали в блокирующий буфер, содержащий 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (SIGMA, США, кат. № A2153) и после отмывки помещали в раствор первичных антител против HSP₇₀ (1 : 500), (Santa Cruz Biotechnology). Затем обрабатывали вторичными антителами (1 : 1000), (биотинилированный анти-мышинный IgG, SIGMA, США, кат. №051M4885). Мембрану помещали в раствор ExtrAvidin-пероксидазы (SIGMA, США, кат. № 051M4885) в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина (1 : 1000). Для визуализации использовали 3-амино-9-этилкарбазола (Sigma, США, кат. № a6926). Детекцию HSP₇₀ осуществляли при помощи денситометрии в программе Adobe Photoshop.

Статистические методы. Статистическая обработка данных научных исследований проводилась с

использованием пакета программ “STATISTICA® for Windows 6.0” (StatSoft Inc., № AXXR712D833214-FAN5), а также “SPSS 16.0”, “Microsoft Office Excel 2003”. Перед применением статистических критериев проводилась проверка гипотезы о нормальном законе распределения случайных величин (по критерию Shapiro-Wilk и Колмогорова-Смирнова). В условиях нормального распределения установления достоверности межгрупповых различий по полученным данным экспериментов проводилось с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента. В случае, когда данные не соответствовали законам нормального распределения, сравнительный анализ проводили с помощью непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни. Для сравнения независимых переменных в более чем двух выборках применяли дисперсионный анализ (ANOVA) при нормальном распределении или критерий Kruskal-Wallis для распределения, отличного от нормального. Для анализа закономерностей связи между отдельными показателями проведен корреляционный анализ с помощью коэффициента корреляции Пирсона или Спирмена. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия $p < 0.05$ (95%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных нами исследований указывают на то, что формирование хронической церебральной ишемии у крыс приводит к смещению тиол-дисульфидной системы в виде уменьшения пула ее восстановленных форм и снижение активности ГПР, GST и ГР ($p < 0.05$) цитозольной фракции вплоть до 18 суток эксперимента по сравнению с показателями ложнооперированных животных (табл. 1–3). Снижение уровня GSH ($p < 0.05$) в головном мозге у крыс с НМК по сравнению с показателями ложнооперированных животных может быть следствием нарушения его синтеза, связанного с нарушением тканевого дыхания, обусловленного ишемией, а также расходом в неэнзиматических реакциях и реакциях катализируемых ГПР, направленных на “утилизацию” свободных радикалов и перекисей [3]. Другой причиной, уменьшения пула внутриклеточного глутатиона, может выявленный нами быть дефицит цистеина (–63.8%), вследствие его активного использования в качестве антиоксиданта [6, 10]. На данном фоне характерным было достоверное повышение уровня гомоцистеина на фоне снижения концентрации метионина. Гомоцистеин является нейротоксичным серосодержащим промежуточным звеном метаболизма метионина, подавляет экспрессию eNOS и увеличивает выработку АФК за счет высвобождения арахидоновой кислоты из тромбоцитов, ингибирует ГПР и ГР. Повышенная концентрация гомоцистеина стимулирует многие пути внутриклеточной пере-

Таблица 1. Влияние РАИЛа и Цитиколина на состояние ферментативного звена тиол-дисульфидной системы в головном мозге животных с хронической церебральной ишемией (ХЦИ) на 18-е сут эксперимента

Группы животных	ГР мкмоль/мг белка/мин	ГПР мкмоль/мг белка/мин	Г-S-T мкмоль/мг белка/мин
Ложнооперированные ($n = 20$)	19.5 ± 1.35	61.8 ± 2.9	15.8 ± 1.07
ХЦИ (контроль) ($n = 20$)	$5.2 \pm 0.42^{\#}$	$34.2 \pm 1.54^{\#}$	$6.1 \pm 0.57^{\#}$
ХЦИ + Цитиколин, 500мг/кг ($n = 20$)	$8.2 \pm 0.45^{* \#}$	$48.8 \pm 3.14^{*}$	$5.2 \pm 0.72^{\#}$
ХЦИ + РАИЛ, 1 мг/кг ($n = 20$)	$10.2 \pm 0.71^{*}$	$57.5 \pm 2.72^{*}$	$14.5 \pm 1.11^{*1}$

Примечание: $^{\#} p < 0.05$ по отношению к группе ложнооперированных животных; $^{*} p < 0.05$ по отношению к контрольной группе; $^1 p < 0.05$ по отношению к группе Цитиколина.

Таблица 2. Влияние РАИЛа и Цитиколина на состояние неферментного звена тиол-дисульфидной системы в головном мозге животных с ХЦИ на 18-е сут эксперимента

Группы животных	SH-группы мкмоль/г ткани	SS-группы мкмоль/г ткани	GSH мкмоль/г ткани	GSSG мкмоль/г ткани
Ложно-оперированные ($n = 10$)	57.3 ± 2.8	3.5 ± 0.2	4.3 ± 0.23	0.033 ± 0.008
ХЦИ (контроль) ($n = 20$)	$24.4 \pm 1.2^{\#}$	$7.2 \pm 0.42^{\#}$	$1.62 \pm 0.05^{\#}$	$0.066 \pm 0.005^{\#}$
ХЦИ + Цитиколин, 500 мг/кг ($n = 20$)	$30.4 \pm 2.8^{*}$	$6.4 \pm 0.51^{\#}$	$2.20 \pm 0.10^{* \#}$	$0.060 \pm 0.004^{\#}$
ХЦИ + РАИЛ, 1 мг/кг ($n = 20$)	$38.6 \pm 3.8^{*}$	$4.5 \pm 0.38^{*1}$	$3.24 \pm 0.22^{*1}$	$0.042 \pm 0.003^{*1}$

Примечание: $^{\#} p < 0.05$ по отношению к группе ложнооперированных животных; $^{*} p < 0.05$ по отношению к контрольной группе; $^1 p < 0.05$ по отношению к группе Цитиколина.

Таблица 3. Влияние РАИЛа и Цитиколина на состояние неферментного звена ТДС и нитрозативного стресса в головном мозге животных с ХЦИ на 18-е сут эксперимента

Группа животных	Гомоцистеин мкмоль/г ткани	Цистеин мкмоль/г ткани	Метионин мкмоль/г ткани	Нитротирозин нмоль/г ткани
Ложно-оперированные ($n = 20$)	2.8 ± 0.26	3.15 ± 0.16	2.86 ± 0.15	18.6 ± 1.23
ХЦИ (контроль) ($n = 20$)	$8.5 \pm 0.52^{\#}$	$1.14 \pm 0.074^{\#}$	$1.25 \pm 0.082^{\#}$	$42.3 \pm 2.32^{\#}$
ХЦИ + Цитиколин, 500 мг/кг ($n = 20$)	$7.7 \pm 0.53^{\#}$	$1.87 \pm 0.057^{* \#}$	$1.71 \pm 0.12^{* \#}$	$30.8 \pm 2.42^{*}$
ХЦИ + РАИЛ, 1 мг/кг ($n = 20$)	$4.1 \pm 0.42^{*1}$	$2.77 \pm 0.093^{*}$	$2.52 \pm 0.11^{*1}$	$24.2 \pm 1.1^{*1}$

Примечание: $^{\#} p < 0.05$ по отношению к группе ложнооперированных животных; $^{*} p < 0.05$ по отношению к контрольной группе; $^1 p < 0.05$ по отношению к группе Цитиколина.

дачи сигналов, включая модификации рецепторов, индукцию различных киназ, например митоген-активирующий белок (MAP) и включение нейроаптоза, а также усиливает эксайтотоксичность за счет стимуляции NMDA и AMPA [1].

На фоне курсового интраназального введения РАИЛа отмечены выраженные изменения, которые характеризовались значимым на 58.2% увеличением восстановленных интермедиатов тиол-дисульфидной системы и повышение на 100% уровня GSH, на фоне снижения содержания его окисленной формы на 36.3% по сравнению с показателями контроля. Важным явилось то, что увеличение уровня GSH в группе, получавшей

РАИЛ, происходило на фоне увеличения цистеина (+143%). Подобные по направленности изменения были отмечены и при использовании Цитиколина, однако параметры зафиксированных значений в этой группе, по выраженности уступали показателям группы животных с введением РАИЛа. Применение РАИЛа также приводило и к снижению содержания в тканях мозга нейротоксических веществ — нитротирозина и гомоцистеина на 42.7 и 51.7% соответственно (табл. 3). При этом снижение гомоцистеина регистрировали на фоне повышения метионина на 101.6%. РАИЛ повышал активность ГР на 96.1%, ГПР на 68.1%,

Таблица 4. Влияние РАИЛа и Цитиколина на содержание HSP₇₀ в головном мозге животных с ХЦИ на 18-е сут эксперимента

Группа животных	HSP ₇₀ , у.е./ г белка	
	Митохондриальная фракция	Цитозольная фракция
Ложнооперированные (<i>n</i> = 20)	7.2 ± 0.21	15.5 ± 0.36
ХЦИ (контроль) (<i>n</i> = 20)	2.1 ± 0.11 [#]	6.4 ± 0.55 [#]
ХЦИ + Цитиколин, 500 мг/кг (<i>n</i> = 20)	2.2 ± 0.54 [#]	7.8 ± 0.52 [#]
ХЦИ + РАИЛ, 1 мг/кг (<i>n</i> = 20)	5.1 ± 0.32 ^{*1}	12.7 ± 0.95 ^{*1}

Примечание: [#] *p* < 0.05 по отношению к группе ложнооперированных животных; ^{*} *p* < 0.05 по отношению к контрольной группе; ¹ *p* < 0.05 по отношению к группе Цитиколина.

а GST на 137.7% относительно показателей контроля.

Увеличение функциональности системы глутатиона, а также повышение активности GSH-ферментов не только приводит к усилению защиты головного мозга от нейротоксических продуктов оксидативного и нитрозативного стресса, но и может запустить GSH-зависимые механизмы эндогенной нейропротекции [10]. Увеличение функциональности тиол-дисульфидной системы в условиях НМК и увеличение его восстановленных интермедиатов, под влиянием РАИЛ, может способствовать повышению биодоступности NO и уменьшению его превращения в цитотоксический пероксинитрит [4], а также уменьшает активность реакций нитрозативного стресса, что проявлялось в виде выраженного снижения уровня нитротирозина [3, 7, 8].

Таким образом, одним из звеньев нейропротективного действия геля РАИЛа в условиях экспериментального НМК является его позитивное влияние на показатели тиол-дисульфидной системы и, особенно, ее глутатионовой части.

Нами обнаружено снижение уровня белка теплового шока HSP₇₀ в цитозоле и митохондриях (*p* < 0.05) головного мозга экспериментальных животных (табл. 4). При курсовом интраназальном введении геля РАИЛа концентрация белка HSP₇₀ в цитозоле гомогената головного мозга животных повышалась на 98.4%, а в митохондриях на 142.8% раз по сравнению с показателями контроля (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о возможном влиянии РАИЛа на HSP₇₀—зависимые механизмы эндогенной нейропротекции при церебральной ишемии. По всей видимости, РАИЛ, блокируя IL-1b, способен регулировать экспрессию HSP₇₀ и GSH. Это новый и перспективный, учитывая концепцию таргетной нейропротекции, механизм действия РАИЛа. Hsp₇₀ блокирует пусковой рецептор апоптоза Fas/Apo-1, ингибирует апо-

птоз в митохондриях на этапе между высвобождением цитохрома С и расщеплением прокаспазы-9, препятствует связи цитохрома С с проапоптотическим белком Araf-1 в митохондриях [1, 6].

HSP₇₀ способен исправлять окислительно поврежденные антиоксидатные ферменты и транспортировать их из цитоплазмы в другие клеточные органеллы [1, 15]. Увеличение экспрессии и/или содержания внутриклеточного HSP₇₀ вызывает торможение передачи пролиферативных, апоптотических, воспалительных сигналов [3]. HSP₇₀ проявляет прямое митопротективное действие, а также поддерживает активность компенсаторного малат-аспаратного челночного механизма в условиях церебральной ишемии, “продолжая” действие HIF-1a, HSP₇₀ самостоятельно поддерживает экспрессию НАД-МДГ-мх [1, 3, 6].

Выявленное у Цитиколина влияние на тиол-дисульфидную систему головного мозга в условиях НМК не противоречит нашим предыдущим результатам и данным других исследователей. Цитиколин проявляет митопротективный эффект, сохраняет целостность внутренней мембраны митохондрии, влияя на уровень кардиолипина [1–3]. Цитиколин опосредовано, через увеличения активности GSH-зависимых ферментов, регулирует участие GSH в механизмах эндогенной нейропротекции [6].

Полученные нами результаты исследования позволяют по-новому оценить механизм нейропротективного действия РАИЛа. РАИЛ, прерывая IL-1b-зависимую экспрессию iNOS, может снизить продукцию цитотоксических форм NO, активность нитрозативного стресса и “расходование” восстановленных интермедиатов ТДС [18]. С учетом полученных нами результатов можно предположить, что РАИЛ может регулировать IL-1b-зависимый транспорт GSH. Возможно, РАИЛ за счет повышения концентрации HSP₇₀ влияет на активацию редокс-чувствительных

факторов транскрипции AP-1, NF- κ B, NF-1, которые повышают экспрессии генов ГПР, ГР и GST, а также генов ферментов, обеспечивающих стабильность внутриклеточной концентрации GSH (γ -глутамилтрансферазы, γ -глутамилцистеинсинтетазы) в условиях хронической церебральной ишемии [3, 6, 19].

ВЫВОДЫ

1. Необратимая окклюзия общих сонных артерий в течение 18 сут приводит к нарушению тиол-дисульфидной системы головного мозга — угнетению активности ГПР, GST и ГР, дефициту SH-групп, восстановленного глутатиона, снижению содержания цистеина, метионина, повышению концентрации окисленного глутатиона и увеличению уровня нитротирозина в цитозоле, а также к дефициту белка теплового шока 70 кДа в цитозоле и митохондриях головного мозга экспериментальных животных.

2. Курсовое интраназальное применение геля РАИЛ в течение 18 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий у крыс способствует улучшению основных показателей тиол-дисульфидной системы, снижению уровня нитротирозина в цитозольной фракции головного мозга. Применение РАИЛ-геля приводит к повышению экспрессию белка теплового шока 70 кДа в цитозоле и митохондриях головного мозга.

3. РАИЛ-гель по степени влияния на показатели тиол-дисульфидной системы и экспрессию HSP₇₀ превосходит референс-препарат Цитиколин.

4. Полученные результаты позволили выявить новые звенья нейропротективного действия РАИЛ в условиях хронической церебральной ишемии, а именно влияние на GSH/HSP₇₀-зависимые механизмы эндогенной нейропротекции, что экспериментально обосновывает перспективность дальнейших исследований этой лекарственной формы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

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. Беленичев И.Ф., Фероз Шах, Чекман И.С., Нагорная Е.А., Горбачева С.В., Горчакова Н.А., Бухтиярова Н.В. // Тиол-дисульфидная система: роль в эн-

догенной цито- и органопротекции, пути фармакологической модуляции. Киев: ТОВ “Видавництво “Юстон”, 2020. 232 с.

2. Чекман И.С., Беленичев И.Ф., Бухтиярова Н.В., Нагорная Е.А., Горчакова Н.А. // Доклиническое изучение специфической активности потенциальных лекарственных средств первичной и вторичной нейропротекции. Методические рекомендации ГП “Государственного экспертного центра МЗ Украины”. Киев, 2016. 80с.
3. Беленичев И.Ф., Черный В.И., Бухтиярова Н.В., Горчакова Н.А. // Нейропротекция и нейропластичность. Киев: Логос, 2015. 512 с.
4. Никонов В.В., Фескиев А.Э., Беленичев И.Ф., Бухтиярова Н.В. // Медицина неотложных состояний. Донецк: Изд. дом Заславского, 2012. 512 с.
5. Liu P., Zhang R., Liu D.g, Wang J., Yuan Ch., Zhao X., Li Y., Ji X., Chi T., Zou L. // J. Physiol. Sci. 2018. V. 68. P. 121–127.
6. Беленичев И.Ф., Бухтиярова Н.В., Черный В.И., Павлов С.В., Колесник Ю.М., Абрамов А.А. // Рациональная нейропротекция. Донецк: Изд. Дом Заславского, 2008. 264 с.
7. Demchenko A.V., Belenichev I.F. // Neurochem. J. 2016. V. 10(1). P. 64–68.
8. Belenichev I.F., Kolesnik Y.M., Pavlov S.V., Sokolik E.P., Bukhtiyarova N.V. // Neurochem. J. 2011. V. 5(4). P. 251–256.
9. Tschoe Ch., Bushnell C.D., Duncan P.W., Alexander-Miller M.A., Wolfe S.Q. // J. Stroke. 2020. V. 22(1). P. 29–46.
10. Aquilano K., Baldelli S., Ciriolo M.R. // Front. Pharmacol. 2014. V. 5. P. 196.
11. Belenichev I.F., Bukhtiyarova N.V. // Neurochem. J. 2014. V. 8(1). P. 24–27.
12. Ruland J. // Nat. Immunol. 2011. V. 12. P. 709–714.
13. Jin R., Yang G., Li G. // J. Leukocyte Biology. 2010. V. 87(5). P. 779–789.
14. Pradillo J.M., Denes A., Greenhalgh A.D. // J. Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2012. V. 32(9). P. 1810–1819.
15. Belenichev I.F., Kolesnik Y.M., Pavlov S.V., Sokolik E.P., Bukhtiyarova N.V. // Neurochem. J. 2012. V. 6(1). P. 22–28.
16. Lundblad R.L., Macdonald F. // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. CRC Press, 2010. 1098 p.
17. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. М.: ФГБУ НЦЭСМП. 2012. 944 с.
18. Сунпрун Э.В. // Дис. ... д. мед. н. Киев. 2011. 348 с.
19. Liu R., Yuan H., Yuan F., Yang S.-H. // Neurological Research. 2012. V. 34(4). P. 331–337.

Pharmacocorrection of Thiol-Disulfide Balance in the Brain of Rats by the Intranasal Form of the IL-1b Antagonist in a Model of Chronic Cerebral Ischemia

I. F. Belenichev^a, B. S. Burlaka^a, N. V. Bukhtiyarova^a,
E. G. Aliyeva^a, E. V. Suprun^b, A. M. Ishchenko^c, and A. S. Simbirtsev^c

^aZaporizhzhya State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

^bKharkov Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkov, Ukraine

^cFSUE "State Research Institute of Especially Purified Bioproducts" FMBA of Russia, St. Petersburg, Russia

We studied the effects of intranasal application of RAIL gel (IL-1b antagonist) to rats with experimental chronic cerebrovascular disorders on the indices of the thiol-disulfide system and heat shock protein HSP₇₀ in the brain. We found that chronic cerebral ischemia (permanent occlusion of the common carotid arteries) shifts the state of thiol-disulfide system: the pool of reduced forms of glutathione and the activity of GPR, GST and GR decreased. Intranasal application of RAIL for 18 days resulted in a 58.2% increase in the reduced intermediates of the thiol-disulfide system and in 100% increase of GSH level, against the background of a 36.3% decrease in the content of its oxidized form compared to the control. The administration of RAIL led to a 98% increase in the heat shock protein HSP₇₀ concentration in the brain of experimental animals. The use of RAIL stabilizes the thiol-disulfide balance and activates HSP70-dependent mechanisms of endogenous neuroprotection.

Keywords: chronic cerebral ischemia, thiol-disulfide system, HSP₇₀, neuroprotection, IL-1b antagonist (RAIL), intranasal gel

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.24

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ЖИВОТНЫХ С FUS-ПРОТЕИНОПАТИЕЙ

© 2021 г. Е. А. Вихарева^{1, *}, М. М. Чичёва¹, М. Б. Евгеньев², С. Ю. Фуников²,
А. В. Дейкин³, С. О. Бачурин¹, А. А. Устюгов¹

¹ФГБУН Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,
Черноголовка, Московская область, Россия

²ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

³ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 03.07.2020 г.

Принята к публикации 04.07.2020 г.

Известно, что шапероны и, в частности, белки теплового шока массой 70 кДа (БТШ70) являются неотъемлемой частью клеточного протеостаза. Чтобы оценить роль БТШ70 в течении нейродегенеративного процесса мы использовали новую гибридную линию мышей с коэкспрессией аберрантного белка Δ FUS(1-359) и БТШ70 человека. Мыши новой гибридной линии характеризуются большей продолжительностью жизни, а также увеличением продолжительности симптоматической стадии по сравнению с контрольными животными. Кроме этого, по результатам физиологических тестов можно сделать вывод о положительном влиянии БТШ70 на мышечную силу на симптоматической стадии течения модельного заболевания.

Ключевые слова: трансгенные животные, шапероны, протеинопатия

DOI: 10.31857/S1027813321010143

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) это одно из самых часто встречаемых возрастных заболеваний моторного нейрона, которое затрагивает спинной и головной мозг. С БАС связано множество генетических мутаций, основные из которых затрагивают Cu/Zn супероксиддисмутазу (SOD1), а также РНК-связывающие белки – TDP-43 и FUS. Большинство случаев заболевания БАС связано с накоплением неправильно свернутых белков, а также их агрегатов [1]. Дегградация таких белков при помощи убиквитинпротеасомной системы или аутофагосомного пути относится к потенциальным терапевтическим мишеням, поскольку эффективность этих механизмов снижается с возрастом [2, 3].

Шапероны (белки теплового шока) и кошапероны обеспечивают внутриклеточный гомеостаз и препятствуют повреждению клеточных белков при повышении температур и других стрессирующих воздействиях внешней среды, а также при старении. Они являются неотъемлемой частью системы протеостаза в эукариотических клетках,

выполняя ключевую роль в процессах сворачивания и созревания белков, а также дегградации белков с неправильной конформацией и агрегатов из них. К семейству белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70) относятся одни из самых распространенных и повсеместно экспрессируемых шаперонов, которые участвуют во многих биологических процессах [4].

В исследованиях, проведенных на клеточных и животных моделях, показано, что повышенная экспрессия БТШ70 способствует снижению олигомеризации α -синуклеина [5, 6], а также ингибирует аккумуляцию полиглутамина, характерную для болезни Хантингтона [7]. Было показано, что введение рекомбинантного человеческого стресс белка (БТШ70) животным с моделью нейродегенерации типа болезни Альцгеймера, а также при сепсисе способно уменьшать клинические проявления этих патологий [8]. Уровень БТШ70 в спинном мозге пациентов со спорадической формой БАС значительно снижен [9], из чего можно предположить его роль в предотвращении развития патогенетического процесса.

Результаты этого исследования также вносят вклад в понимание роли БТШ70 в развитие процесса протеинопатии.

* Адресат для корреспонденции: 142432 Россия, Московская область, г. Черноголовка, Северный пр-д, 1; e-mail: ekaterina.ipac@gmail.com.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Для этого исследования была создана новая гибридная линия животных с коэкспрессией аберрантного белка Δ FUS(1-359) [1] и БТШ70 человека [10]. Генотип животных подтверждали при помощи ПЦР. Для определения наличия трансгенных кассет использовался метод ПЦР с использованием коммерческого набора GenPak PCR Core (ISOGENE laboratory Ltd., Россия). Для детекции вставки FUS использовалась смесь праймеров: FUS_for: TCTTTGTGCAAGGCCTGGGT, FUS_rev: TAATCATGGGCTGTCCCGTT (Evrogen, Россия, C = 100 мкм) – 0.2 мкл. Для детекции вставки HSP использовалась смесь праймеров: HSP_for: AAGACCCTCCTCCTGTATGG, HSP_rev: TCAGACGCAACTCAGCAC (Evrogen, Россия, C = 100 мкм) – 0.2 мкл.

Для исследования использовали только самцов. В качестве контроля использовали гемизиготных особей по трансгенной кассете FUS(1-359), а также животных с экспрессией человеческой изоформы белка теплового шока 70 кДа (HSP^{Het}) и животных дикого типа (CD1).

Методы оценки локомоторных функций. Оценку моторных функций трансгенных животных проводили при помощи тестов: “сила хватки”, “перевернутая сетка”, а также анализировали изменение походки при помощи установки CatWalk (Noldus, США). Животных тестировали в возрастных точках 30, 60, 90 и 120 дней, соответствующих разным стадиям развития модельного заболевания. Силу хватки передними лапами оценивали при помощи динамометра, каждое животное тестировали 3 раза. В качестве результата представлена сумма сил хватки в трех попытках.

В тесте “перевернутая сетка” животное помещали на сетку (размер ячейки 1 × 1 см), которую затем поднимали на высоту 1 м и переворачивали на 180° таким образом, чтобы мышь оказалась снизу, и выдерживали в течение 60 с. Фиксировали время проведенное на сетке в трех последовательных попытках с разницей 30 мин. В качестве результата представлено среднее время удержания на сетке в трех попытках. В данном тесте оценивается выносливость животного.

Дополнительно был проведен анализ изменения координации и походки животных на установке CatWalk. Животных помещали в темный коридор, подсвеченный снизу, и давали возможность свободно проходить в любом направлении. Каждое животное должно было совершить 3 успешных пробежки (“успешность” определяется программным обеспечением Noldus).

Протоколы экспериментального исследования на животных и методы эвтаназии согласованы с Комиссией по биоэтике ИФАВ РАН (протокол заседания Комиссии по биоэтике № 30 от 15.04.2019 г.).

Иммуногистохимия. Для иммуногистохимического анализа брали шейный отдел спинного мозга, как у животных гибридной линии FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het}, так и у FUS(1-359)^{Het} в качестве контроля. Ткани забирали в двух временных точках – 60 и 90 дней, каждая группа состояла из трех животных. Образцы ткани были зафиксированы раствором параформальдегида 4% и заключены в парафин. Проводили иммунофлуоресцентное окрашивание трансгенной аберрантной формы FUS(1-359), которую визуализировали с помощью антител против N-концевого фрагмента белка FUS (Abcam, Великобритания). Эндogenous FUS белок визуализирован с помощью окрашивания антителами против C-концевого фрагмента белка FUS (SantaCruzBiotech, США), который отсутствует у FUS(1-359).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начиная с возраста 60 дней, животных ежедневно осматривали для детектирования начала симптоматической стадии болезни. Кривая выживаемости Каплан–Майера показывает, что у двойных трансгенов FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} средний возраст гибели был выше по сравнению с контрольными животными линии FUS(1-359)^{Het} и FUS(1-359)^{Homo} (рис. 1). Эти данные также коррелируют со средним возрастом начала манифестаций и продолжительности симптомов (рис. 2).

Другим важным физиологическим параметром, отражающим общую оценку здоровья, является прирост массы. Как правило, здоровые животные имеют стабильный прирост, тогда как начало патологического процесса часто коррелирует с флуктуациями в массе животных. В нашем исследовании было установлено, что прирост массы мышей двойных трансгенов FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} схож с приростом массы мышей дикого типа и трансгенных животных с экспрессией человеческой изоформы hHSP^{Het}, тогда как у трансгенных гемизиготных животных FUS(1-359)^{Het} этот показатель снижен. Было установлено, что пик падения прироста массы для двойных трансгенов (FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het}) приходится на возраст 140 дней, тогда как у животных FUS^{Het} – на 130 день.

Сила хватки у животных FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} в возрастной группе 60 дней достоверно превышала значения группы животных FUS(1-359)^{Het} в этом же возрасте. Однако с возрастом сила хватки к 120 дню снижалась у животных FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} и достоверно не отличалась от животных FUS(1-359)^{Het}, тогда как показатели в двух других контрольных группах (контрольные животные дикого типа WT и животные с экспрессией hHSP^{Het}) неуклонно росли (рис. 3a). Такого рода данные могут свидетельствовать о потенциаль-

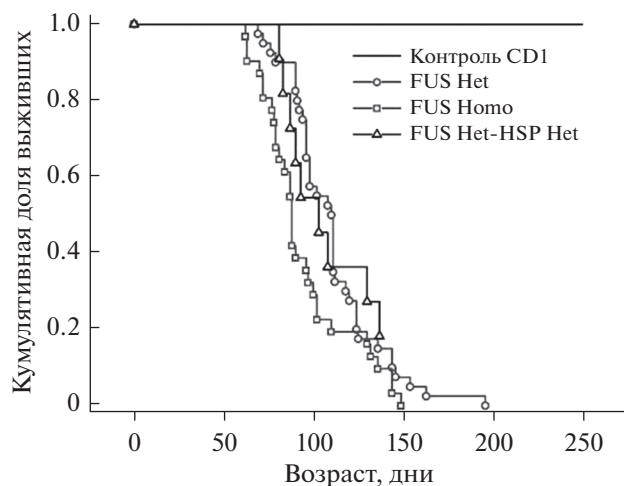


Рис. 1. Сравнение кривых выживаемости (по Каплану-Мейеру) между группами модельных животных с двойным трансгеном FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} ($n = 40$), FUS(1-359)^{Het} ($n = 42$), FUS(1-359)^{Homo} ($n = 45$) и животными дикого типа линии CD1 ($n = 11$).

ном терапевтическом эффекте БТШ70 на ранних стадиях заболевания, когда в тканях трансгенных животных с развивающейся протеинопатией еще не детектируются отложения. Вероятнее всего, с возрастом накопление внутриклеточных FUS-позитивных отложений приводит к гибели мотонейронов и прогрессии протеинопатии.

Результаты теста “перевернутая сетка” показали, что достоверные отличия были обнаружены у животных FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} и FUS(1-359)^{Het} в возрастных группах 30 и 90 дней (рис. 3б), что свидетельствует о том, что животные гибридной

линии с экспрессией человеческой изоформы hHSP^{Het} были выносливее трансгенных животных линии FUS(1-359)^{Het}.

Дополнительно был проведен анализ изменения координации и походки животных на установке CatWalk. Ранее были определены критерии, которые позволяли оценить основные параметры моторной дисфункции, отличающиеся у контрольных животных дикого типа и трансгенных животных линии FUS(1-359)^{Het}. Однако, несмотря на большое количество выявленных критериев, наиболее физиологически релевантным оказалось изменение средней скорости движения животного. Достоверные отличия скорости движения в группах FUS(1-359)^{Het} и FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} наблюдались во всех возрастных группах (рис. 4). Однако стоит отметить, что показатели скорости животных в группе FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} достоверно отличались во всех тестируемых возрастных группах относительно контрольной группы животных дикого типа. Это может свидетельствовать о том, что нейропротекторный эффект БТШ70 был недостаточным для полного восстановления двигательных функций до значений, наблюдаемых у контрольной группы.

Для определения роли БТШ70 в накоплении FUS(1-359)-позитивных отложений провели иммунофлуоресцентный анализ гистопатологических отложений в спинном мозге трансгенных животных. Оказалось, что у гибридной линии трансгенных животных FUS-HSP общая плотность FUS(1-359)-позитивно окрашенных клеток ниже по сравнению с трансгенными животными линии FUS Het в обеих возрастных точках, выбранных для анализа. Для количественной оценки этого

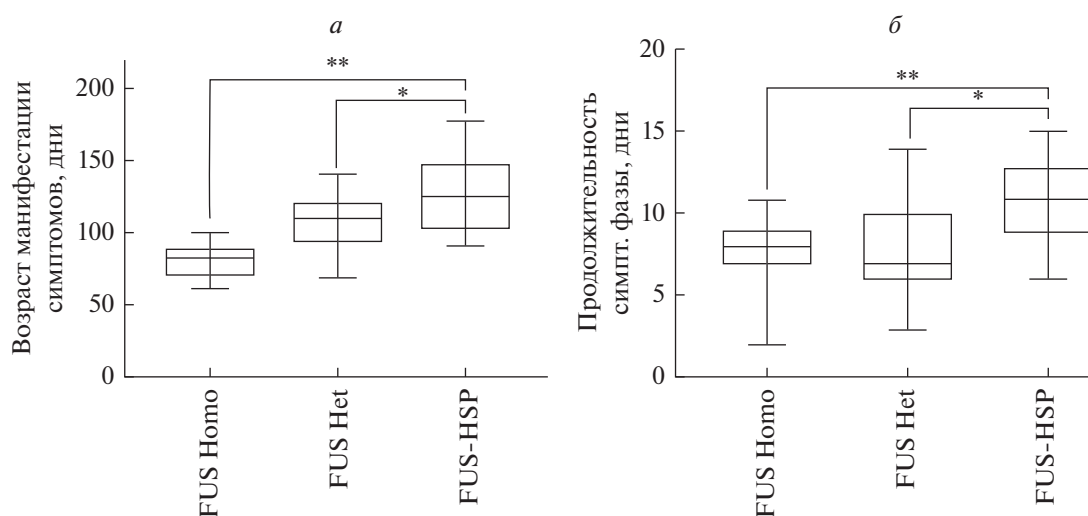


Рис. 2. Манifestация и продолжительность клинических симптомов у трансгенных животных. Средний возраст начала (а) и продолжительности симптоматического периода (б) у животных с двойным трансгеном FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} ($n = 39$), гемизиготных FUS(1-359)^{Het} ($n = 60$) и гомозиготных FUS(1-359)^{Homo} ($n = 53$). Уровень достоверности оценивался согласно непараметрическому t -критерию Вилкоксона–Манна–Уитни: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

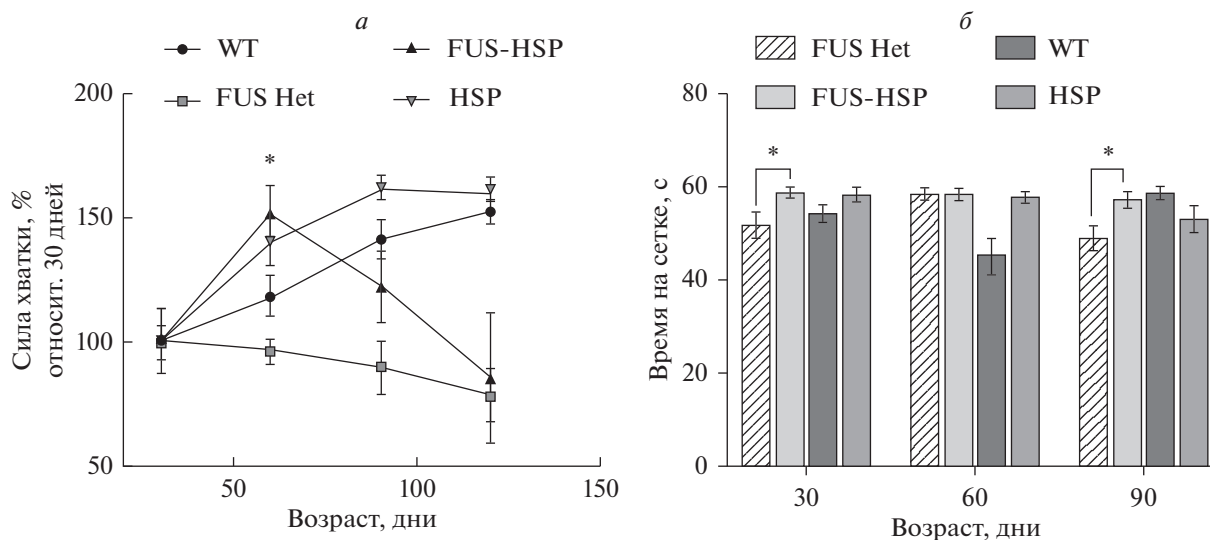


Рис. 3. Результаты теста “сила хватки” (а) и среднее время удерживания на перевернутой сетке (б) для групп FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} ($n = 13$), FUS(1-359)^{Het} ($n = 9$), дикого типа CD1 (WT) ($n = 7$), а также hHSP^{Het} ($n = 11$). Уровень достоверности оценивался согласно непараметрическому t -критерию Вилкоксона–Манна–Уитни: * $p < 0.05$.

параметра использовали отношение плотности сигнала эндогенного белка FUS к экзогенному (рис. 5).

Известно, что белки теплового шока играют важную роль в обеспечении гомеостаза организма, а также являются частью нейропротекторной

системы. Возрастные изменения совпадают с нейродегенеративными процессами, связанными с накоплением в нервной системе различных белковых отложений. Поведенческая характеристика и фенотипирование новой гибридной линии животных выявили, что экспрессия белка БТШ70 человека способствует увеличению продолжительности жизни в условиях развивающейся протеинопатии. Это один из первых важных результатов, указывающих на возможность использования препаратов на основе БТШ70 в качестве лекарственного средства для лечения нейродегенеративных расстройств. Полученные результаты по оценке возраста манифестации и продолжительности симптоматической фазы (оба значения увеличивались) у FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} животных могут свидетельствовать о болезнью-модифицирующих свойствах привнесенного БТШ70. Это также поддерживает вывод об основной роли БТШ70 в качестве нейропротекторного агента при развивающейся FUS-протеинопатии, что подтверждается результатами иммуногистохимического окрашивания срезов спинного мозга.

Можно отметить, что биологическая роль БТШ70 при развивающейся протеинопатии на физиологическом уровне заключается в увеличении выносливости, мышечной силы и улучшении координации трансгенных животных, моделирующих нейродегенеративное заболевание.

При детальном анализе отложений было выявлено, что нейроны в передних рогах шейного отдела спинного мозга (в зоне от третьего сегмента L3 до пятого L5) у трансгенных животных линии FUS Het образуют гистопатологические включения, которые не встречаются в этих же сегментах

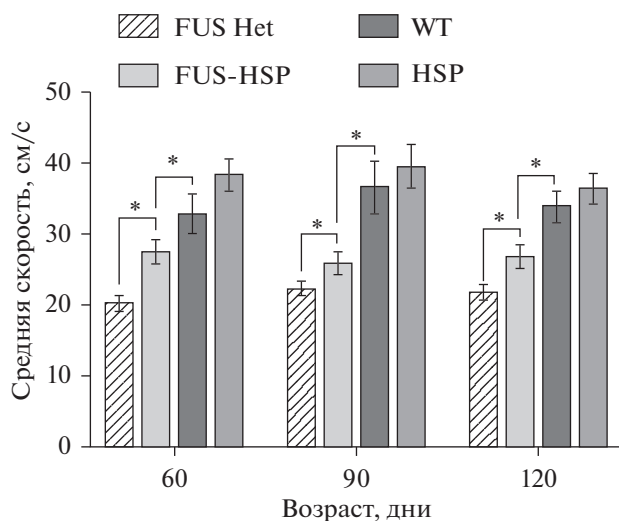


Рис. 4. Результаты характеристики средней скорости движения животных в установке NoldusCatwalk у трансгенных животных в разных возрастных группах (60, 90 и 120 дней). Количество животных с двойным трансгеном FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} ($n = 13$), FUS(1-359)^{Het} ($n = 9$), животных дикого типа линии CD1 (WT, $n = 7$) и животных с экспрессией человеческой изоформы БТШ70 (HSP, $n = 11$). Уровень достоверности оценивался согласно непараметрическому t -критерию Вилкоксона–Манна–Уитни: * $p < 0.05$.

Отношение интенсивности флуоресцентного сигнала эндогенного белка FUS к экзогенному

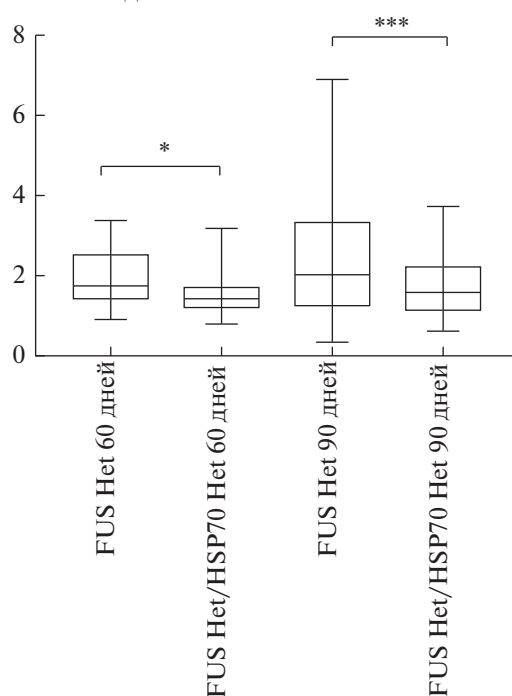


Рис. 5. Сравнение отношения флуоресцентного сигнала эндогенного белка FUS к экзогенному у животных с двойным трансгеном FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} и FUS(1-359)^{Het}. Уровень достоверности оценивался согласно непараметрическому *t*-критерию Вилкоксона—Манна—Уитни: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

спинного мозга у гибридной линии животных FUS-HSP. Вполне возможно, что наличие трансгенной человеческой изоформы БТШ70 может влиять на формирование сложных внутриклеточных отложений, являющихся причиной развивающейся протеинопатии. Следовательно, наличие человеческой изоформы БТШ70 в трансгенных животных может выполнять функцию шаперона, которая препятствует формированию белковых отложений, тем самым проявляя нейропротекторные свойства.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках РНФ № 19-13-00378 и соответствует теме Госзадания ИФАВ РАН № 0090-2019-0005 (содержание и фенотипирование трансгенных животных) с использованием оборудования ЦКП ИФАВ РАН. Линии мышей созданы и предоставлены для проведения экспериментов ЦКП Геномное редактирование при поддержке Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными выполнены в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [11]. Протоколы экспериментального исследования на животных и методы эвтаназии согласованы с Комиссией по биоэтике ИФАВ РАН (протокол заседания Комиссии по биоэтике № 30 от 15.04.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shelkovernikova T.A., Peters O.M., Deykin A.V., Connor-Robson N., Robinson H., Ustyugov A.A., Bachurin S.O., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., Kovrazhkina E.A., Skvortsova V.I., Ling S.C., Da Cruz S., Parone P.A., Buchman V.L., Ninkina N.N. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 35. P. 25266–25274.
2. Labbadia J., Morimoto R.I. // Annu. Rev. Biochem. 2015. № 84. P. 435–464.
3. Yerbury J.J., Ooi L., Dillin A., Saunders D.N., Hatters D.M., Beart P.M., Cashman N.R., Wilson M.R., Ecroyd H. // J. Neurochem. 2016. № 137. P. 489–505.
4. Lackie R.E., Maciejewski A., Ostapchenko V.G., Marques-Lopes J., Choy W.-Y., Duennwald M.L., Prado V.F., Prado M. // Front. Neurosci. 2017. P. 11–254.
5. Outeiro T.F., Putcha P., Tetzlaff J.E., Spoelgen R., Koker M., Carvalho F., Hyman B.T., McLean P.J. // PLoS One. 2008. № 3. P. e1867.
6. Putcha P., Danzer K.M., Kranich L.R., Scott A., Silinski M., Mabbett S., Hicks C.D., Veal J.M., Steed P.M., Hyman B.T., McLean P.J. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010. № 332. P. 849–857.
7. Sittler A., Lurz R., Lueder G., Priller J., Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U., Leirach H., Wanker E.E. // Hum. Mol. Genet. 2001. № 10. P. 1307–1315.
8. Bobkova N.V., Garbuz D.G., Nesterova I., Medvinskaya N., Samokhin A., Alexandrova I., Yashin V., Karpov V., Kukharsky M.S., Ninkina N.N., Smirnov A.A., Nudler E., Evgen'ev M.E. // J. Alzheimer's Dis. 2014. V. 2. № 38. P. 425–435.
9. Chen H.-J., Mitchell J.C., Novoselov S., Miller J., Nishimura A.L., Scotter E.L., Vance C.A., Cheetham M.E., Shaw C.E. // Brain J. Neurol. 2016. № 139. P. 1417–1432.
10. Gurskiy Y.G., Garbuz D.G., Soshnikova N.V., Krasnov A.N., Deikin A., Lazarev V.F., Sverchinsky D., Margulis B.A., Zatsepina O.G., Karpov V.L., Belzhelarskaya S.N., Feoktistova E., Georgieva S.G., Evgen'ev M.B. // Cell Stress Chaperones. 2016. V. 21. № 6. P. 1055–1064.
11. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Восьмое издание. / Пер. с англ. Под ред. Белозерцевой И.В., Блинова Д.В., Красильщиковой М.С. М.: ИРБИС, 2017. 336 с.
12. Funikov S.Y., Rezyukh F.P., Mazin P.V., Morozov A.V., Mal'tsev A.V., Chicheva M.M., Vikhareva E.A., Evgen'ev M.B., Ustyugov A.A. // Neurogenetics. 2018. V. 19(3). P. 189–204.

The Role of Heat Shock Proteins on Life Duration and Behavioral Functions of Mice with FUS-Proteinopathy

**E. A. Vikhareva^a, M. M. Chicheva^a, M. B. Evgen'ev^b, S. Yu. Funikov^b,
A. V. Deikin^c, S. O. Bachurin^a, and A. A. Ustyugov^a**

^a*Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russia*

^b*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^c*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

It is known that chaperones and heat shock proteins with molecular weight 70 kDa, in particular, are one of therapeutic targets for proteinopathy treatment. The new transgenic animal line with a simultaneous expression of HSP70 and the pathogenic aberrant form of FUS in the nerve tissues was investigated in order to evaluate a role of HSP70 protein in neurodegenerative process. The new hybrid mice are characterized by increased longevity as well as increased duration of symptomatic stage compared with control animals. In addition, based on physiological test, it can be concluded that human HSP70 has positive effect on muscle force at the symptomatic stage of model disease.

Keywords: transgenic animals, chaperons, proteinopathy

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.25

СЕРОТОНИНОВЫЕ 5-НТ_{1A}, 5-НТ_{2A} И 5-НТ₇ РЕЦЕПТОРЫ В МОЗГЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ BTBR-МОДЕЛИ АУТИЗМА

© 2021 г. А. Я. Родный^{1, *, **}, Е. А. Куликова^{1, *}, Е. М. Кондаурова¹, В. С. Наumenко¹

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

Поступила в редакцию 06.05.2020 г.

После доработки 08.06.2020 г.

Принята к публикации 06.07.2020 г.

Расстройства аутистического спектра (РАС) являются одной из самых больших эпидемиологических проблем человечества. Несмотря на огромные усилия научного сообщества, механизмы, лежащие в основе РАС, далеки от понимания. Данные о роли серотониновой (5-НТ) системы мозга в развитии РАС скудны и противоречивы. В данной работе мы исследовали функциональный ответ и экспрессию 5-НТ_{1A}, 5-НТ_{2A} и 5-НТ₇ рецепторов в структурах мозга мышей линии BTBR, широко используемой в качестве модели аутизма. Мыши BTBR продемонстрировали значительное снижение опосредованной 5-НТ_{1A} рецепторами гипотермической реакции по сравнению с мышами линии C57BL/6J. При этом существенной разницы между мышами линий BTBR и C57BL/6J как по уровню мРНК гена 5-НТ_{1A} рецептора, так и по уровню белка рецептора во всех исследуемых структурах мозга обнаружено не было. Функциональный ответ 5-НТ_{2A} рецепторов, так же как и уровень белка 5-НТ_{2A} рецепторов у мышей линии BTBR и у мышей линии C57BL/6J не различались. Однако уровень мРНК гена 5-НТ_{2A} рецепторов был снижен в гиппокампе мышей BTBR. Функциональная активность, уровень мРНК и белка 5-НТ₇ рецепторов у мышей BTBR были неизменны в сравнении с мышами линии C57BL/6J. Таким образом, было показано, что функциональная активность 5-НТ_{1A} рецепторов значительно снижена в мозге мышей линии BTBR без существенных изменений экспрессии 5-НТ_{1A} рецепторов. При этом изменена экспрессия гена 5-НТ_{2A} рецептора при неизменной функциональной активности и уровне белка 5-НТ_{2A} рецепторов. Экспрессия и функциональный ответ 5-НТ₇ рецепторов не отличались в исследованных структурах мозга изучаемых линий мышей.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, аутизм, мыши BTBR, серотониновая система мозга, 5-НТ_{1A}, 5-НТ_{2A} и 5-НТ₇ рецепторы, функциональная активность, уровень мРНК, уровень белка

DOI: 10.31857/S102781332101009X

ВВЕДЕНИЕ

Количество пациентов с расстройствами аутистического спектра (РАС) постоянно растет [1]. РАС возникают в результате нарушения развития мозга и характеризуются ярко выраженным нарушением социального взаимодействия и повторяющимися действиями [2]. Несмотря на интенсивные исследования, причины этих расстройств далеки от полного понимания. В настоящее время данные, полученные как с помощью нейровизуализации, так и на посмертных образцах мозга больных РАС, указывают на вовлечение в механизмы этих расстройств серотониновой (5-НТ) системы мозга [3].

Известно, что 5-НТ система участвует в регуляции различных типов поведения, включая социальное поведение [3]. Такая полифункциональность 5-НТ системы основана на существовании многочисленных рецепторов, опосредующих действие нейротрансмиттера в мозге. Наиболее изучаемым членом семейства серотониновых рецепторов является 5-НТ_{1A} рецептор. Этот рецептор сопряжен с G_i-белком и ингибирует аденилатциклазу при активации. 5-НТ_{1A} рецепторы, являясь ключевыми регуляторами серотониновой системы мозга, [4] могут локализоваться как пост-, так и пресинаптически. Пресинаптические 5-НТ_{1A} рецепторы регулируют секрецию 5-НТ в синаптической щели [5]. Кроме того, 5-НТ_{1A} рецепторы вовлечены в регуляцию различных физиологических функций и психопатологических расстройств [6]. В то же время функциональное состояние 5-НТ_{1A} рецепторов может контролироваться другими серото-

* Авторы внесли равный вклад.

**Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр-кт Академика Лаврентьева, 10; тел.: (383) 363-61-87; e-mail: aleksandr1994rodny@gmail.com.

ниновыми рецепторами. Так, например, 5-HT_{2A} рецептор может формировать гетеродимеры с 5-HT_{1A} рецептором [7] и влиять на его функционирование [8, 9]. 5-HT₇ рецептор также способен формировать гетеродимеры с 5-HT_{1A} рецептором, значительно влияя на функцию последнего [10, 11].

5-HT_{2A} рецепторы привлекают к себе внимание ученых, поскольку вовлечены в механизмы различных психопатологий [12]. Эти рецепторы сопряжены с G_q-белком и активируют фосфолипазу C при активации [5]. У взрослых людей с РАС методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии было показано снижение плотности 5-HT_{2A} рецепторов в поясной извилине, лобной и височной коре [13], хотя более поздние исследования с помощью позитронно-эмиссионной томографии показали противоречивые результаты [14]. Снижение числа сайтов связывания 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} рецепторов было выявлено в коре задней части поясной извилины и коре веретенообразной извилины в посмертных образцах ткани головного мозга у молодых людей с диагнозом аутизм [15]. В то же время значительно более высокий уровень мРНК гена 5-HT_{2A} рецептора был обнаружен в тромбоцитах детей, страдающих аутизмом [16]. Также в посмертных образцах ткани головного мозга пациентов с аутизмом было показано снижение радиолигандного связывания серотонина с 5-HT_{1A} рецепторами [3]. Еще один интенсивно изучаемый в последнее время 5-HT₇ рецептор сопряжен с G_s-белком и активирует аденилатциклазу при активации [5]. Несмотря на вовлечение 5-HT₇ рецепторов в регуляцию функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов, прямых доказательств участия 5-HT₇ рецепторов в механизмах РАС нет [17]. В то же время исследования однонуклеотидных полиморфизмов в генах 5-HT_{2A} [18–20] и 5-HT₇ [21] рецепторов указывает на связь между этими рецепторами и РАС.

Для более глубокого исследования механизмов РАС и, в частности, роли 5-HT системы в данных расстройствах очень важно использовать адекватные модели заболевания. Широко используемой моделью РАС являются мыши линии BTBR T^{Itpr3/J} (BTBR). Мыши линии BTBR демонстрируют основные поведенческие характеристики, определяющие РАС, в том числе нарушение социальных взаимодействий и повторяющееся, стереотипное поведение [22]. Показано, что плотность 5-HT нейронов увеличивается в среднем мозге и уменьшается в гиппокампе мышей BTBR. Кроме того, уровень 5-HT в мозге этих животных также снижается в гиппокампе [23, 24]. Селективный ингибитор обратного захвата серотонина — флуоксетин — и неселективный агонист 5-HT_{1A} рецепторов — бупирон — повышают интенсивность социального взаимодействия у мышей BT-

BR. При этом способность активировать G-белок у 5-HT_{1A} рецепторов гиппокампа мышей BTBR выше, чем у мышей линии C57BL/6J, хотя по плотности 5-HT_{1A} рецепторов мыши не различаются [24]. Показано, что блокада 5-HT_{2A} рецептора в стриатуме снижает частоту повторений стереотипного поведения [25] и улучшает когнитивную деятельность [26] у мышей BTBR.

Однако функциональное состояние 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} и 5-HT₇ рецепторов, а также экспрессия этих рецепторов в мозге мышей BTBR до сих пор не изучены. В связи с этим целью данного исследования было изучение функциональной активности 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} и 5-HT₇ рецепторов и их экспрессии в мозге BTBR мышей по сравнению с мышами линии C57BL/6J.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперименты были проведены на взрослых (2–3 мес.) самцах мышей линий BTBR (весом 28 ± 1 г) и C57BL/6J (весом 27 ± 0.3 г). Все процедуры проводили с 15:00 до 18:00 ч. Животных содержали в клетках Optimice® в стандартных условиях (20–22°C), свободный доступ к еде и воде, 12-часовой цикл свет/темнота). За два дня до выведения из эксперимента мышей рассаживали в индивидуальные клетки для снятия групповых эффектов. После чего мышей декапитировали, на льду выделяли кору, гиппокамп и область ядер шва среднего мозга, замораживали структуры мозга в жидком азоте и хранили при –80°C до процедуры выделения общей РНК и белка. Работы с животными проводили с использованием ресурсов Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Дизайн эксперимента. В исследовании использовалось по 24 животных каждого генотипа. По 8 животных каждой линии для проведения молекулярных исследований, по 8 животных каждой линии для оценки функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов, после этого через 3 суток им проводили также исследование функциональной активности 5-HT_{2A} рецепторов, а также по 8 животных каждой линии для исследования функциональной активности 5-HT₇ рецепторов.

Оценка функциональной активности 5-HT рецепторов. Функциональную активность 5-HT_{1A} рецепторов оценивали по выраженности гипотермического ответа на острое введение агониста 5-HT_{1A} рецепторов 8-OH-DPAT (8-гидрокси-2-(ди-*n*-пропиламино)тетралин, Sigma Aldrich, США) (1 мг/кг, в/б) [27, 28]. По данным, полученным ранее [29], этот лиганд можно рассматривать как селективный агонист 5-HT_{1A} рецепторов. Температура тела была измерена ректально при помощи

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж}$, °C	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Htr1a</i>	F 5'-ctgtgacctgtttatcgccctg-3' R 5'-gtagtctatagggtcggtgattgc-3'	62	200
<i>Htr2a</i>	F 5'-agaagccacctgtgtgtga-3' R 5'-ttgctcattgctgatggact-3'	61	169
<i>Htr7</i>	F5'-ggctacacgatctactccaccg-3' R5'-cgcacactcttcacctccttc-3'	65	198
<i>rPol2</i>	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaatttgcgtact-3'	60	194

КЖТ термометра (Hanna Instruments, Сингапур) с ректальным датчиком для мышей (Physitemp Instruments, Clifton NJ, США). Выраженность гипотермического ответа выражали в разнице между начальной температурой тела и температурой, измеренной через 20 мин после инъекции препарата (ΔT , °C).

Функциональная активность 5-HT_{2A} рецепторов была оценена по количеству встряхиваний головой (head-twitches), вызванных введением агониста 5-HT_{2A} рецепторов DOI ((±)–1–(2,5-диметокса-4-йодофенил)2-аминопропан гидрохлорид) (1 мг/кг, в/бр) [30]. Подсчет встряхиваний головой начинали через 5 мин после введения препарата и продолжали в течение 20 мин.

Функциональную активность 5-HT₇ рецепторов определяли по интенсивности гипотермического ответа на введение селективного агониста 5-HT₇ рецепторов LP44 (4-[2-(метилтио)фенил]-N-(1,2,3,4-тетрагидро-1-нафталенил)-1-пиперазингексамид гидрохлорид) (20.5 нмоль, i.c.v.) [29]. Соединение растворяли в стерильной воде и вводили в левый боковой желудочек мозга (i.c.v.) путем микроинъекции с помощью стереотаксической установки TSE (Германия) по следующим координатам: –0.5 for AP, –1.6 mm for L, 2 mm for DV [31]. Животных предварительно усыпляли, помещая в пары диэтилового эфира на 20–30 с [32]. Используемая доза препарата (20.5 нмоль) была установлена в исследовании, проведенном нами ранее [29]. Выраженность гипотермического ответа выражали в разнице между начальной температурой тела и температурой, измеренной через 20 мин после инъекции препарата (ΔT , °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 [33–35]. Для амплификации кДНК исследуемых генов использовали пары специфических праймеров (табл. 1). Для количественного анализа уровня мРНК генов использовали два типа стандартов: внешний и внутренний. Внутренний стандарт (мРНК гена *rPol2*) применяли

для контроля обратной транскрипции в качестве основы для расчета уровня мРНК исследуемых генов. В предварительных опытах не были выявлены различия в уровне мРНК гена *rPol2* в исследуемых структурах мозга. Внешним стандартом служила серия разведений выделенной из печени мыши ДНК с известной концентрацией, что позволило контролировать ПЦР и определять число копий мРНК исследуемых генов в образцах. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК гена *rPol2*.

Вестерн-блот анализ. Уровни рецепторов были оценены в коре, гиппокампе и среднем мозге. Подготовка образцов и количественная оценка белковых полос были выполнены, как обсуждалось ранее [36]. Мы использовали следующие первичные антитела: поликлональные кроличьи анти-5-HT_{1A} рецептор (52 кДа, разбавление 1 : 1000; abcam ab85615, Abcam, Великобритания), поликлональные кроличьи анти-5-HT_{2A} рецептор (52 кДа, разбавление 1 : 300; Novus NBP1-49172, Novus Biologicals, США), моноклональные кроличьи анти-5-HT₇ рецептор (54 кДа, разбавление 1 : 500; abcam ab128892, Abcam, Великобритания), моноклональные анти-GAPDH, конъюгированные с пероксидазой хрена (37 кДа, разбавление 1 : 500; sc-47724; Santa Cruz Biotechnology Inc., США) при 4°C на ночь и вторичные козы анти-кролик IgG-HRP (разбавление 1 : 10000; sc-2004, Santa Cruz Biotechnology Inc., США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Количество белка рецептора оценивается как процент интенсивности флуоресценции полосы рецептора к флуоресценции полосы GAPDH.

Статистический анализ. Результаты были представлены как $m \pm SEM$ и сравнены при помощи однофакторного дисперсионного анализа с последующим *post-hoc* анализом по Фишеру. Статистическая значимость была на уровне $p < 0.05$. Критерий Диксона использовался для выявления и исключения крайних отклонений из анализа.

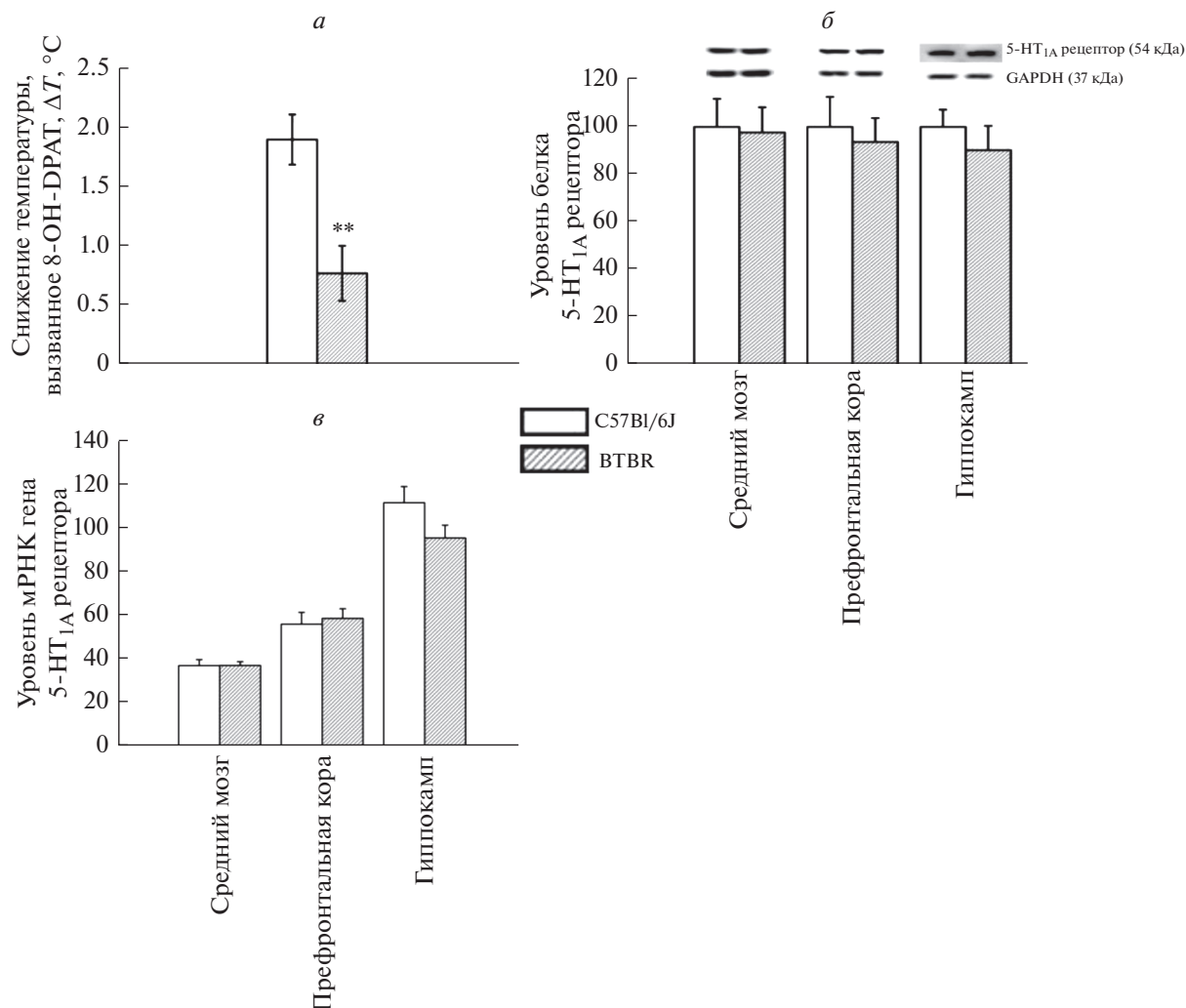


Рис. 1. *а* – Функциональный ответ 5-HT_{1A} рецептора, оцененный по интенсивности гипотермического ответа на введение 8-ОН-ДРАТ (1 мг/кг, в/бр) у мышей C57BL/6J и BTBR. Выраженность гипотермического ответа представлена как разница между начальной температурой тела и температурой, измеренной через 20 мин после введения 8-ОН-ДРАТ; *б* – Уровень белка 5-HT_{1A} рецептора в среднем мозге, префронтальной коре и гиппокампе мышей C57BL/6J и BTBR. Уровень белка рецептора 5-HT_{1A} нормализован на GAPDH. *в* – Уровень мРНК гена 5-HT_{1A} в среднем мозге, префронтальной коре и гиппокампе мышей C57BL/6J и BTBR. Экспрессия гена представлена как количество копий кДНК рецептора отнесенное на 100 копий кДНК гена *rPol2*, которую использовали в качестве калибратора. Все значения представлены в виде $m \pm SEM$. $N \geq 5$. ** $p < 0.01$ по сравнению с C57BL/6J.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Между мышами линий BTBR и C57BL/6J было обнаружено существенное различие в функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов. Острое введение агониста 5-HT_{1A} рецепторов 8-ОН-ДРАТ в дозе 1.0 мг/кг вызвало значительный гипотермический ответ у мышей C57BL/6J, в то время как у мышей BTBR опосредованная 5-HT_{1A} рецепторами гипотермическая реакция была значительно менее выражена ($F_{1,13} = 12.93$, $p < 0.01$) (рис. 1*а*). В то же время не было обнаружено влияния генотипа на экспрессию гена, кодирующего 5-HT_{1A} рецепторы во всех исследованных структурах мозга ($F_{1,13} < 1$ для среднего мозга; $F_{1,10} < 1$

для коры; $F_{1,9} = 2.20$, $p > 0.05$ для гиппокампа) (рис. 1*в*). Также между мышами линий BTBR и C57BL/6J не было обнаружено различия по уровню белка 5-HT_{1A} рецептора во всех исследованных структурах мозга ($F_{1,14} < 1$ для среднего мозга; $F_{1,11} = 3.52$, $p > 0.05$ для коры; $F_{1,10} < 1$ для гиппокампа) (рис. 1*б*).

Мыши линии BTBR не отличались от контрольных мышей C57BL/6J по функциональной активности 5-HT_{2A} рецепторов. Острое введение агониста 5-HT_{2A} рецепторов DOI в дозе 1 мг/кг вызвало сходное количество встряхиваний головой у мышей обеих исследованных линий ($F_{1,12} = 1.56$, $p > 0.05$) (рис. 2*а*). Также не было обнаружено из-

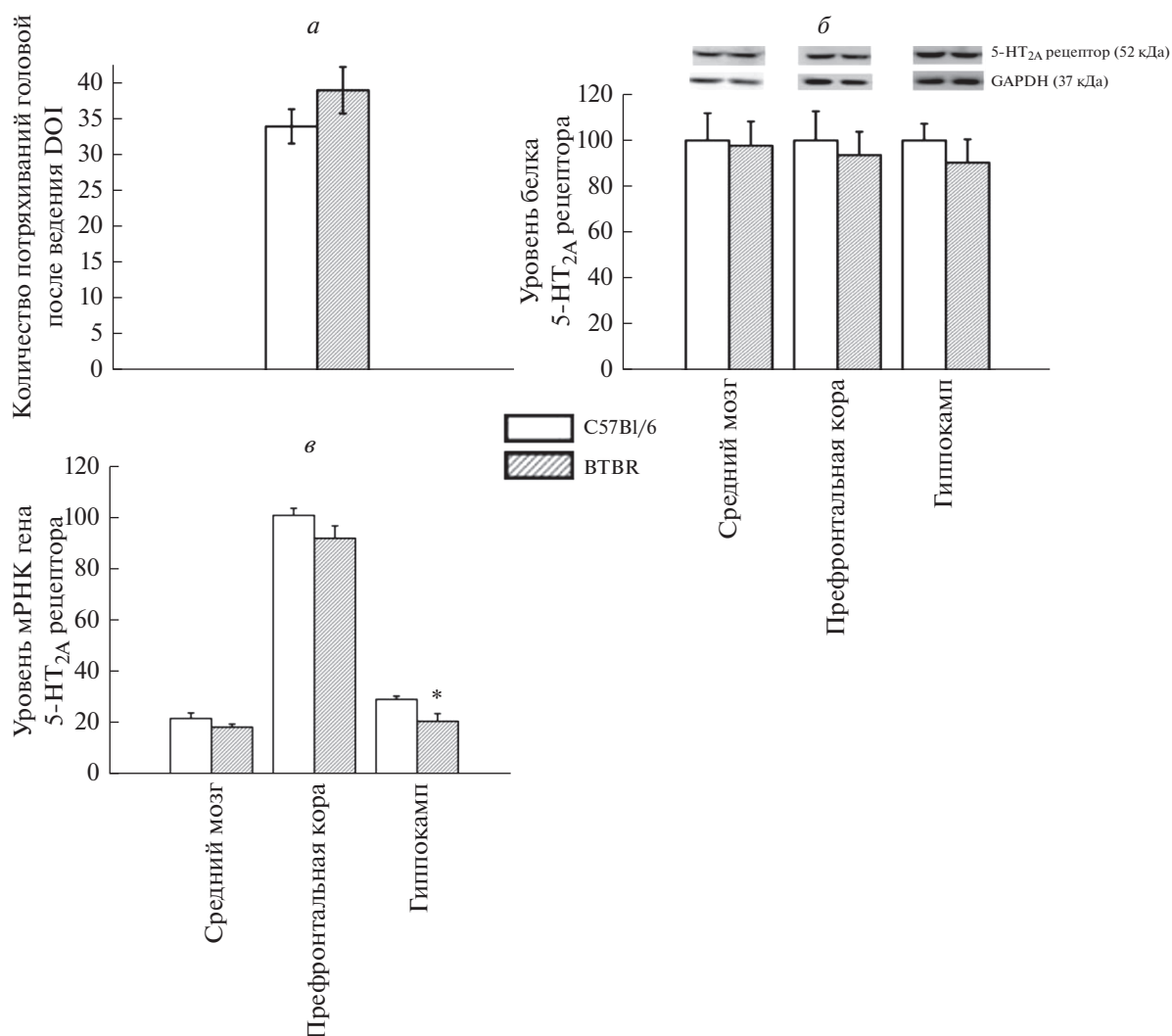


Рис. 2. *а* – Функциональный ответ 5-HT_{2A} рецептора, оцененный по количеству встряхиваний головой, вызванных введением DOI (1 мг/кг, в/бр), у мышей C57BL/6J и BTBR; *б* – Уровень белка 5-HT_{2A} рецептора в среднем мозге, префронтальной коре и гиппокампе мышей C57BL/6J и BTBR. Уровень белка рецептора 5-HT_{2A} нормализовался на GAPDH. *в* – Уровень мРНК гена 5-HT_{2A} рецепторов в среднем мозге, префронтальной коре и гиппокампе мышей C57BL/6J и BTBR. Экспрессия гена представлена как количество копий кДНК рецептора, отнесенное на 100 копий кДНК гена *rPol2*, которую использовали в качестве калибратора. Все значения представлены в виде $m \pm SEM$. $N \geq 6$. * $p < 0.05$ по сравнению с C57BL/6J.

менений в уровне белка 5-HT_{2A} рецепторов во всех исследованных структурах мозга ($F_{1,13} < 1$; для коры, $F_{1,14} < 1$, для гиппокампа и $F_{1,13} < 1$, для среднего мозга) мышей линии BTBR (рис. 2б). В коре ($F_{1,14} = 2.6$, $p > 0.05$) и среднем мозге ($F_{1,13} = 1.9$, $p > 0.05$) не было обнаружено различий и по уровню мРНК гена 5-HT_{2A} рецептора. Однако уровень мРНК гена 5-HT_{2A} рецептора был снижен в гиппокампе мышей BTBR по сравнению с мышами линии C57BL/6J ($F_{1,10} = 8.4$, $p < 0.05$) (рис. 2в).

Между мышами BTBR и C57BL/6J не было обнаружено различий как в функциональном ответе 5-HT₇ рецепторов ($F_{1,14} < 1$) (рис. 3а), так и в уровне мРНК ($F_{1,14} < 1$; для коры, $F_{1,13} < 1$; для гиппо-

кампа и $F_{1,13} = 1.3$; $p > 0.05$ для среднего мозга) (рис. 3в) и уровне белка 5-HT₇ рецепторов ($F_{1,13} < 1$; для коры, $F_{1,13} < 1$; для гиппокампа и $F_{1,14} < 1$; для среднего мозга) (рис. 3б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мыши линии BTBR являются наиболее широко используемой моделью РАС, демонстрирующей высокую валидность [22]. В данном исследовании мы впервые продемонстрировали, что у мышей линии BTBR снижена функциональная активность 5-HT_{1A} рецепторов, что отражается в снижении выраженности гипотермической реак-

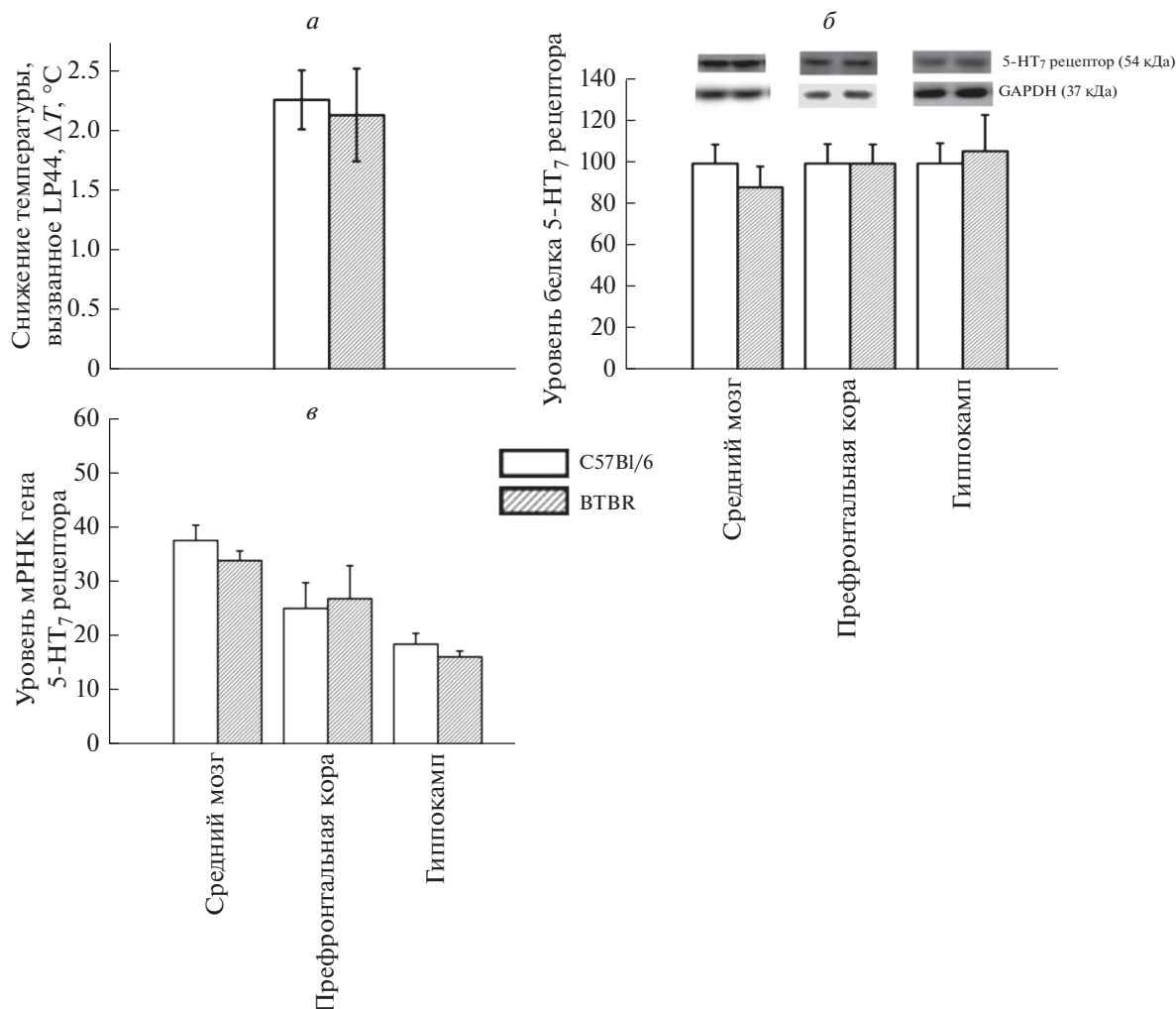


Рис. 3. а – Функциональный ответ 5-HT₇ рецептора, оцененный по интенсивности гипотермического ответа на введение LP44 (20.5 нмоль, i.s.v.) у мышей C57BL/6J и BTBR. Выраженность гипотермического ответа представлена как разница между начальной температурой тела и температурой, измеренной через 20 мин после введения LP44; б – Уровень белка 5-HT₇ рецептора в среднем мозге, префронтальной коре и гиппокампе мышей C57BL/6J и BTBR. Уровень белка рецептора 5-HT₇ нормализован на GAPDH; в – Уровень мРНК гена 5-HT₇ рецепторов в среднем мозге, префронтальной коре и гиппокампе мышей C57BL/6J и BTBR. Экспрессия гена представлена как количество копий кДНК, рецептора отнесенное на 100 копий кДНК гена *rPol2*, которую использовали в качестве калибратора. Все значения представлены в виде $m \pm SEM$. $N \geq 6$.

ции в ответ на введение агониста 5-HT_{1A} рецепторов – 8-OH-DPAT. При этом мыши BTBR не отличаются от мышей линии C57BL/6J по уровню мРНК и белка 5-HT_{1A} рецепторов во всех исследованных структурах мозга.

Поскольку функциональный ответ 5-HT_{1A} рецепторов оценивался по выраженности гипотермической реакции в ответ на активацию рецептора, можно предположить, что изменения в выраженности снижения температуры тела отражают не чувствительность рецепторов, а нарушение в системе терморегуляции у мышей BTBR. Однако отсутствие изменений в опосредуемом 5-HT₇ рецепторами гипотермическом ответе дает основание за-

ключить, что система терморегуляции у мышей BTBR функционирует сходным с мышами C57BL/6J образом.

Ранее было показано, что способность активировать G-белок у 5-HT_{1A} рецепторов гиппокампа мышей BTBR выше, чем у мышей линии C57BL/6J, хотя по плотности 5-HT_{1A} рецепторов эти мыши не различаются [24]. Наши данные о сниженной функциональной активности при неизменной экспрессии 5-HT_{1A} рецепторов в мозге мышей BTBR позволяют предположить компенсаторный характер повышения эффективности активации G-белка 5-HT_{1A} рецепторами в мозге мышей BTBR. Также следует отметить, что сниженная функциональная

активность 5-HT_{1A} рецепторов согласуется и с фармакологическими данными, демонстрирующими, что агонист 5-HT_{1A} рецепторов — буспирон — повышает интенсивность социальных взаимодействий у мышей BTBR [24].

Можно предположить, что выявленное нами снижение функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов у мышей BTBR может быть связано с изменениями в цепи передачи сигнала рецептора или с посттрансляционной регуляцией его функции. Недавно мы показали, что посттрансляционное пальмитоилирование 5-HT_{1A} рецептора играет решающую роль в регуляции функционирования рецепторов и, как следствие, в механизмах депрессивно-подобного поведения животных и депрессии у человека [37]. Нарушение пальмитоилирования 5-HT_{1A} рецепторов может объяснить снижение функционального ответа рецепторов без существенных изменений их экспрессии. Другим возможным механизмом наблюдаемого изменения функционального ответа 5-HT_{1A} рецепторов у мышей BTBR является гетеродимеризация 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов. Ранее было показано, что гетеродимеризация 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов усиливает интернализацию 5-HT_{1A} рецепторов, что приводит к снижению их функционального ответа, но не оказывает влияния на функциональную активность 5-HT₇ рецепторов [10, 11, 38, 39]. И в данной работе также не было обнаружено изменений в функциональной активности и экспрессии 5-HT₇ рецепторов в структурах мозга мышей линии BTBR.

Известно, что блокада 5-HT_{2A} рецепторов при помощи антагонистов приводит к снижению повторений стереотипного поведения и улучшению когнитивной деятельности у мышей линии BTBR [25, 26]. Принимая во внимание эти данные, можно предположить, что обнаруженное в данной работе снижение уровня мРНК 5-HT_{2A} рецепторов в гиппокампе мышей BTBR направлено на облегчение патологического поведения у этих мышей. Кроме того, наши результаты отчасти согласуются с данными о снижении плотности рецепторов 5-HT_{2A} у пациентов с РАС [13].

Интересно отметить, что среди трех исследованных в работе рецепторов 5-HT системы мозга изменения были обнаружены в двух. Причем если для 5-HT_{1A} рецепторов было обнаружено снижение функциональной активности без вовлечения генетической регуляции, то для 5-HT_{2A} рецепторов, напротив, было показано снижение уровня мРНК без существенных изменений уровня белка и функциональной активности рецептора.

ВЫВОДЫ

Таким образом, мыши BTBR, наряду с аутистическими поведенческими чертами [22], демонстрируют снижение функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов при их неизменной экспрессии, что, однако, хорошо согласуется с литературными данными о роли рецептора 5-HT_{1A} в социальном дефиците, связанном с аутизмом. Полученные нами результаты позволяют предположить изменения в посттрансляционной модификации и/или регуляции функционального состояния 5-HT_{1A} рецепторов. Кроме того, у мышей линии BTBR снижен уровень мРНК 5-HT_{2A} рецепторов в гиппокампе без существенных изменений в функциональной активности и уровне белка 5-HT_{2A} рецепторов. В то же время экспрессия и функциональный ответ 5-HT₇ рецепторов у мышей BTBR не отличался от мышей линии C57BL/6J во всех исследованных структурах мозга.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых докторов (грант № МД-1120.2019.4). Стоимость содержания животных была поддержана бюджетным проектом № 0324-2019-0041 и реализована с использованием оборудования Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН при поддержке Министерства образования и науки РФ. (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ:

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет 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). Также работа с животными регламентировалась 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 01.07.2015 г.). Условия содержания животных и проведенные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Emberti Gialloreti L., Curatolo P.* // *Frontiers in neurology*. 2018. V. 9. № 9. P. 670.
2. *Myers S.M., Johnson C.P.* // *Pediatrics*. 2007. V. 120. № 5. P. 1162–1182.
3. *Muller C.L., Anacker A.M.J., Veenstra-VanderWeele J.* // *Neuroscience*. 2016. V. 321. № 3. P. 24–41.
4. *Popova N.K., Naumenko V.S.* // *Rev. Neurosci.* 2013. V. 24. № 2. P. 191–204.
5. *Barnes N.M., Sharp T.* // *Neuropharmacology*. 1999. V. 38. № 8. P. 1083–1152.
6. *Hall M.D., el Mestikawy S., Emerit M.B., Pichat L., Hamon M., Gozlan H.* // *J. Neurochem.* 1985. V. 44. № 6. P. 1685–1696.
7. *Borrito-Escuela D.O., Narvaez M., Ambrogini P., Ferraro L., Brito I., Romero-Fernandez W., Andrade-Talavera Y., Flores-Burgess A., Millon C., Gago B., Narvaez J.A., Odagaki Y., Palkovits M., Diaz-Cabiale Z., Fuxe K.* // *Molecules*. 2018. V. 23. № 6. P. 1341–1357.
8. *Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Zubkov E.A., Kulikov A.V.* // *Genes, brain, and behavior*. 2010. V. 9. № 5. P. 519–524.
9. *Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M.* // *Zh. Vyssh. Nervn. Deyat. im. I.P. Pavlova*. 2015. V. 65. № 2. P. 240–247.
10. *Renner U., Zeug A., Woehler A., Niebert M., Dityatev A., Dityateva G., Gorinski N., Guseva D., Abdel-Galil D., Frohlich M., Doring F., Wischmeyer E., Richter D.W., Neher E., Ponimaskin E.G.* // *J. Cell Science*. 2012. V. 125. № Pt 10. P. 2486–2499.
11. *Naumenko V.S., Popova N.K., Lacivita E., Leopoldo M., Ponimaskin E.G.* // *CNS Neurosci. Ther.* 2014. V. 20. № 7. P. 582–590.
12. *Carhart-Harris R.L., Nutt D.J.* // *J. Psychopharmacol.* 2017. V. 31. № 9. P. 1091–1120.
13. *Murphy D.G., Daly E., Schmitz N., Toal F., Murphy K., Curran S., Erlandsson K., Eersels J., Kerwin R., Ell P., Travis M.* // *Am. J. Psychiatry*. 2006. V. 163. № 5. P. 934–936.
14. *Girgis R.R., Slifstein M., Xu X., Frankle W.G., Anagnostou E., Wasserman S., Pepa L., Kolevzon A., Abi-Dargham A., Laruelle M., Hollander E.* // *Psychiatry Res.* 2011. V. 194. № 3. P. 230–234.
15. *Oblak A., Gibbs T.T., Blatt G.J.* // *Autism research: official j. of the International Society for Autism Research*. 2013. V. 6. № 6. P. 571–583.
16. *Kazek B., Huzarska M., Grzybowska-Chlebowczyk U., Kajor M., Ciupinska-Kajor M., Wos H., Marszal E.* // *Acta Neurobiol. Exp.* 2010. V. 70. № 2. P. 232–238.
17. *Ciranna L., Catania M.V.* // *Front. Cell. Neurosci.* 2014. V. 8. № 8. P. 250.
18. *Hranilovic D., Blazevic S., Babic M., Smurinic M., Bujas-Petkovic Z., Jernej B.* // *Psychiatry Res.* 2010. V. 178. № 3. P. 556–558.
19. *Cho I.H., Yoo H.J., Park M., Lee Y.S., Kim S.A.* // *Brain Res.* 2007. V. 1139. № 30. P. 34–41.
20. *Abdelrahman H.M., Sherief L.M., Alghobashy A.A., Abdel Salam S.M., Hashim H.M., Abdel Fattah N.R., Mohamed R.H.* // *Research in developmental disabilities*. 2015. V. 36C. P. 485–490.
21. *Helsmoortel C., Swagemakers S.M., Vandeweyer G., Stubbs A.P., Palli I., Mortier G., Kooy R.F., van der Spek P.J.* // *Am. J. Med. Genet., Part B*. 2016. V. 171. № 8. P. 1049–1056.
22. *Stephenson D.T., O'Neill S.M., Narayan S., Tiwari A., Arnold E., Samaroo H.D., Du F., Ring R.H., Campbell B., Pletcher M., Vaidya V.A., Morton D.* // *Mol. Autism*. 2011. V. 2. № 1. P. 7.
23. *Lau A.A., Tamang S.J., Hemsley K.M.* // *J. Inherited Metab. Dis.* 2018. V. 41. № 4. P. 669–677.
24. *Gould G.G., Hensler J.G., Burke T.F., Benno R.H., Onaivi E.S., Daws L.C.* // *J. Neurochem.* 2011. V. 116. № 2. P. 291–303.
25. *Amodeo D.A., Rivera E., Cook E.H., Jr., Sweeney J.A., Ragozzino M.E.* // *Genes, brain, and behavior*. 2017. V. 16. № 3. P. 342–351.
26. *Amodeo D.A., Jones J.H., Sweeney J.A., Ragozzino M.E.* // *Autism research: official j. of the International Society for Autism Research*. 2014. V. 7. № 5. P. 555–567.
27. *Overstreet D.H., Rezyani A.H., Knapp D.J., Crews F.T., Janowsky D.S.* // *Psychiatr. Genet.* 1996. V. 6. № 3. P. 107–117.
28. *Popova N.K., Naumenko V.S., Plyusnina I.Z., Kulikov A.V.* // *J. Neurosci. Res.* 2005. V. 80. № 2. P. 286–292.
29. *Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Popova N.K.* // *Neuropharmacology*. 2011. V. 61. № 8. P. 1360–1365.
30. *Green A.R., Heal D.J.* // *Neuropharmacology of serotonin* / Ed Green A.R. Oxford: Oxford University, 1985. P. 326–365.
31. *Slotnick B.M., Leonard C.M.* // *A stereotaxic atlas of the albino mouse forebrain*, Rockville, Maryland: U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1975. P. 174.
32. *Kondaurova E.M., Naumenko V.S., Popova N.K.* // *Neurosci. Lett.* 2012. V. 522. № 1. P. 52–56.
33. *Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K.* // *J. Neurosci. Methods*. 2005. V. 141. № 1. P. 97–101.
34. *Naumenko V.S., Kulikov A.V.* // *Mol. Biol.* 2006. V. 40. № 1. P. 37–44.
35. *Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V.* // *J. Neurosci. Methods*. 2008. V. 170. № 2. P. 197–203.
36. *Kulikova E.A., Khotkin N.V., Illarionova N.B., Sorokin I.E., Bazhenova E.Y., Kondaurova E.M., Volcho K.P., Khotenko T.M., Salakhutdinov N.F., Ponimaskin E., Naumenko V.S., Kulikov A.V.* // *Neuroscience*. 2018. V. 394. № 1. P. 220–231.
37. *Gorinski N., Bijata M., Prasad S., Wirth A., Abdel Galil D., Zeug A., Bazovkina D., Kondaurova E., Kulikova E., Ilchibaeva T., Zareba-Kozioł M., Papaleo F., Scheggia D., Kochlamazashvili G., Dityatev A., Smyth I., Krzystyniak A., Włodarczyk J., Richter D.W., Strekalova T., Sigrist S., Bang C., Hobuss L., Fiedler J., Thum T., Naumenko V.S., Pandey G., Ponimaskin E.* // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3924.
38. *Popova N.K., Ponimaskin E.G., Naumenko V.S.* // *Russ. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova*. 2015. V. 101. № 11. P. 1270–1278.
39. *Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Naumenko V.S.* // *Mol. Biol.* 2017. V. 51. № 1. P. 157–165.

Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₇ Receptors in the Brain of Mice of BTBR Strain – The Model of Autism

A. Ya. Rodnyy^a, E. A. Kulikova^a, E. M. Kondaurova^a, and V. S. Naumenko^a

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

Autism spectrum disorders (ASDs) are among the biggest epidemiological problems of humanity. Despite the enormous efforts of the scientific community, the mechanisms underlying the ASDs are far from being understood. Data on the brain serotonin (5-HT) system role in the development of ASDs are scarce and contradictory. Here we examined the functional response and expression of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and 5-HT₇ receptors in the brain structures of BTBR mice, a widely used model of autism. BTBR mice showed a significant decrease in the 5-HT_{1A} receptor-mediated hypothermic response compared to control C57BL/6J mice. Herewith, there was no significant difference between BTBR and C57BL/6J mice both in the 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein level in all investigated brain structures. The functional response of the 5-HT_{2A} receptor as well as its protein level did not differ between BTBR and control mice. However, the 5-HT_{2A} receptor gene mRNA was reduced in the hippocampus of BTBR mice. The functional activity, mRNA and protein levels for 5-HT₇ receptors were unchanged in BTBR mice compared with C57BL/6J mice. Thus, it was shown that the 5-HT_{1A} receptor functional activity was significantly reduced in the brain of BTBR mice without significant changes in the 5-HT_{1A} receptor expression. At the same time, the expression of the 5-HT_{2A} receptor gene was changed along with unaltered 5-HT_{2A} receptor functional activity and protein level. The expression and functional response of 5-HT₇ receptor did not differ in all investigated brain structures of the studied mouse strains.

Keywords: autism spectrum disorders, autism, BTBR mice, brain serotonin system, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₇ receptors, functional response, mRNA level, protein level

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 615.21+612.014

ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ НАРУШЕНИЙ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ МОЗГА ПОТОМСТВА МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c ПРИ ВВЕДЕНИИ ВАЛЬПРОАТА НАТРИЯ БЕРЕМЕННЫМ САМКАМ: НЕЙРОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ

© 2021 г. В. С. Кудрин¹ *, В. Б. Наркевич¹, А. А. Алымов¹, И. Г. Капица¹, К. А. Касабов¹,
Н. В. Кудряшов¹, В. Г. Коньков¹, Т. А. Воронина¹

¹ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.06.2020 г.

После доработки 15.09.2020 г.

Принята к публикации 05.10.2020 г.

Проводилось изучение состояния дофамин-, серотонин- и норадренергических систем в различных структурах мозга мышей-самцов линии BALB/c на 15, 42 и 64 день постнатального развития (ПНР) при моделировании расстройств аутистического спектра, индуцированных введением вальпроата натрия (400 мг/кг, п/к) беременным самкам. Установлено, что уровень как катехол-, так и индоламинов в структурах мозга мышат контрольной группы в возрасте 15 дней существенно ниже, чем у взрослых животных в возрасте 64 дней. Пренатальное введение вальпроата натрия (ВН) вызывало снижение всех параметров моноаминанергической нейротрансмиттерной системы в стриатуме потомства мышей в возрасте 15 дней, но не оказывало влияния на нейробиохимические изменения в других изученных структурах мозга. К 42 дню ПНР общий паттерн изменения концентраций нейротрансмиттеров не отличался от динамики созревания нейротрансмиттерных систем контрольной группы. В дальнейшем уровень ДА возрастал и к 64 дню ПНР не отличался от показателей контрольной группы. Параметры серотонинергической системы изменялись по сходной схеме, при этом содержание серотонина достигало максимума к 42 дню, после чего незначительно снижалось к 64 дню, тогда как уровень 5-ОИУК в стриатуме увеличивался постепенно и максимальные отличия наблюдались к 64 дню ПНР. Таким образом, полученные нами данные позволяют предполагать, что введение ВН беременным самкам отражается на активности дофамин- и серотонинергической систем мозга потомства, вызывая снижение ее активности в стриатуме к 15 дню ПНР с последующим восстановлением до контрольных значений к 64 дню.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, вальпроат натрия, мыши BALB/c, онтогенетическое развитие, ВЭЖХ, дофамин, серотонин, метаболиты

DOI: 10.31857/S1027813321010064

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) представляют собой группу комплексных дезинтегративных нарушений психического развития, характеризующихся отсутствием способности к социальному взаимодействию, коммуникации, стереотипностью поведения, приводящим к социальной дезадаптации. На сегодняшний день среди различных гипотез патогенеза заболевания одними из основных являются нейробиохимические гипотезы, которые рассматривают генез РАС как следствие нарушения формирования нейротрансмиттерных систем мозга в онтогенезе. В частности, выдвинута гипотеза о повреждающем действии

дисбаланса возбуждающих (глутамат, аспартат) и тормозных (глицин) аминокислот на головной мозг в пренатальном развитии [1, 2]. Другая группа теорий рассматривает в качестве ключевого фактора формирования РАС нарушение онтогенетического развития моноаминанергических систем мозга, в первую очередь серотонинергической [3]. По данным клинических исследований, у 30% (по некоторым данным, до 66%) от числа детей с диагностированным синдромом аутизма наблюдается существенное увеличение концентрации серотонина в плазме крови (гиперсеротонинемия). Функциональное состояние серотонинергической системы мозга зависит от скорости обратного захвата серотонина пресинаптическими нейронами, осуществляемого транспортером обратного захвата серотонина (СЕРТ) [4]. Генетически обусловленная высокая активность СЕРТ при-

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, Балтийская ул., д. 8; e-mail: kudrinvs@mail.ru.

водит к подавлению активности серотонинергической нейротрансдачи, проявляется повышенной агрессией и гиперактивностью [5, 6].

Данная информация послужила основанием для использования лекарственных средств, воздействующих на серотонинергическую систему, для лечения РАС [7]. Так, использование фенфлурамина, антидепрессанта, увеличивающего высвобождение серотонина и одновременно препятствующего обратному захвату, вызывало улучшение клинической картины у 30% пациентов с аутистическими расстройствами [8]. Рисперидон, антагонист серотониновых и дофаминовых рецепторов, также оказался эффективен в облегчении поведенческих симптомов аутизма, в том числе для снижения самоповреждений [9]. По данным Гориной и соавторов, у больных РАС в онтогенезе нарушается баланс моноаминергических нейромедиаторов серотонина, дофамина и норадреналина, особенно отчетливо это проявляется в возрасте 1 г. и 5 лет: в плазме крови наблюдается снижение содержания серотонина (в 4.9 раза), дофамина (в 2.8 раза) и норадреналина (в 1.2–1.4 раза). Развитие этих нарушений соответствует критическим периодам формирования различных структур головного мозга, что может приводить к проявлению симптомов аутизма [10, 11].

Целью данной работы являлось изучение изменений нейрохимических параметров мозга в онтогенезе мышей линии BALB/c в условиях введения вальпроата натрия (ВН) беременным самкам. Данная экспериментальная модель наиболее часто используется для моделирования РАС [12, 13]. Проводилось изучение состояния дофамин-, серотонин- и норадренергических систем в различных структурах мозга мышей-самцов линии BALB/c на 15, 42 и 64 день (соответственно P15, P42 и P64) постнатального развития (ПНР) (т.е. вплоть до половозрелого состояния) контрольной группы (0.9% NaCl) и группы потомства самок, получавших ВН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Опыты проведены на 31 самце мыши линии BALB/c массой тела 10–22 г, родительское поколение которых получено из питомника филиала “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий ФМБА” (Россия), содержащихся в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. Для исключения влияния суточных биоритмов на скорость биосинтеза и метаболизма нейромедиаторов эксперименты проводили между 10 и 12 ч дня.

Препараты. Вальпроат натрия (ВН) вводили однократно, подкожно, в дозе 400 мг/кг самкам мышей на 12.5-й день беременности. Самки мы-

шей, потомство которых составило контрольную группу, в эти же сроки получали физиологический раствор в эквивалентном объеме (0.1 мл на 10 г веса). Новорожденных мышат-самцов (31 особь: 14 контрольных и 17 пренатально получавших ВН) отлучали от самок на 21-е сутки жизни, рассаживая по 4–5 животных в клетку (43.5 × 27.5 × 15.5 см).

Схема эксперимента. Животные были разделены на следующие экспериментальные группы (в скобках указано количество животных):

1. Контроль (потомство интактных самок, получавших физиологический раствор):

1а. Группа “P15” ($n = 4$);

1б. Группа “P42” ($n = 6$);

1в. Группа “P64” ($n = 4$).

2. Опыт (потомство самок, получавших ВН):

2а. Группа “P15” ($n = 8$);

2б. Группа “P42” ($n = 3$);

2в. Группа “P64” ($n = 6$).

Нейрохимические исследования. На 15, 42 или 64 день ПНР животных декапитировали, после чего структуры мозга (гипоталамус, стриатум и гиппокамп) извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и взвешивали. Пробы хранили в жидком азоте. Перед экспериментами по определению содержания нейротрансмиттеров пробы размельчали в гомогенизаторе Поттера (тефлон–стекло) в 1 мл 0.1 N HClO₄ с добавлением 3,4-диоксибензиламина (0.5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Содержание моноаминов и их метаболитов (норадреналина (НА), дофамина (ДА), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК)) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, США) с аналитической колонкой ReproSil-Pur ODS (C18, 100 × 4 мм, 3 мкм) (Dr. Maisch, Германия) при скорости элюции подвижной фазы 1.0 мл/мин и давлении до 200 атм. Мобильная фаза состояла из: 0.1 M цитратно-фосфатного буфера, содержащего 1.1 mM октансульфоновой кислоты, 0.1 mM ЭДТА и 9%-го ацетонитрила (pH 3.0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4B (BAS, США) на двойном стеклоугольном электроде (+0.85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Регистрация образцов проводилась с применением аппаратно-программного комплекса “Мультихром” 1.5 (“Амперсенд”) [14]. Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о. с. ч. или analytical grade.

После проверки на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка достоверность

отличий между группами определяли методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Ньюмана–Кейлса, используя в качестве анализируемых факторов возраст животных и используемые вещества (GraphPad Prizm 8.0, GraphPad Software, Inc. США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что на 15 и 42 сут ПНР нейрoхимический профиль структур мозга существенно отличается от показателей зрелых животных возрастом 64 дня, при этом отличия носили разнонаправленный характер. Так, показатели метаболизма ДА-ДОФУК/ДА, ГВК + 3-МТ/ДА и ДОФУК + ГВК + 3-МТ/ДА в гипоталамусе были существенно выше, чем у взрослых (64 дней) животных (на 100–150%), и снижались с увеличением возраста животных, что говорит об активации скорости метаболизма и сдвиге баланса в сторону накопления нейротрансмиттера по мере созревания мозга (рис. 1). Показатель скорости утилизации серотонина – 5-ОИУК/5-ОТ – в той же структуре был ниже в группах “Р42” и “Р64” по сравнению с тем же параметром 15-дневных животных. Интересно отметить, что показатели указанных групп практически не отличались друг от друга, что может свидетельствовать о созревании серотонинергической системы гипоталамуса к 42-му дню. Сходный паттерн развития последней отмечался и в гиппокампе (рис. 1).

Наиболее динамичное онтогенетическое развитие нейротрансмиттерных систем наблюдалось в стриатуме. Так, содержание ДА в этой структуре выросло почти в 2 раза в период с 15 по 42 сут ПНР, после чего уже к 64 дню развитие практически не изменялось (рис. 2). При этом содержание ДОФУК с 15 по 64 день плавно снижалось. Уровень ГВК сокращался похожим образом, но после 42 дня изменений уже не наблюдалось. Напротив, концентрация 3-МТ к 42 дню ПНР резко возросла (с 3.75 до 11.5 нмоль/г), а к 64 дню она незначительно снизилась. Динамика изменений всех показателей метаболизма ДА (ДОФУК/ДА, ГВК/ДА, ГВК + 3-МТ/ДА и ДОФУК + ГВК + 3-МТ/ДА) имела сходный паттерн – максимальное снижение в период с 15 по 42 сут онтогенеза, затем более плавное уменьшение к 64 дню. Показатель скорости утилизации серотонина изменялся по той же схеме.

Иная картина онтогенетических изменений нейрoхимических параметров структур мозга наблюдалась в группе мышей, матерям которых на 12.5 сут беременности вводили ВН. В гипоталамусе ВН практически не влиял на показатели ДА-ергической системы, за исключением параметра ДОФУК/ДА группы “Р15”, который был более

низким по сравнению с контролем. Показатель метаболизма серотонина 5-ОИУК/5-ОТ постепенно снижался с 15 по 42 сут ПНР. Подобное снижение этого параметра наблюдалось и в другой структуре – гиппокампе (рис. 1).

ВН в стриатуме вызывал достоверное снижение уровня ДА у мышат на 15 день ПНР по сравнению с контролем, при этом паттерн увеличения содержания этого нейротрансмиттера в этот период был более плавным, чем на 42 и 64 сут ПНР (рис. 2). Интересно отметить, что уровни ДОФУК и ГВК в той же структуре были также ниже соответствующих значений контрольной группы, при этом достоверно различались лишь показатели на 15 сут ПНР. Профиль изменения прочих показателей ДА-ергической передачи (ДОФУК/ДА, ГВК/ДА, ГВК + 3-МТ/ДА и ДОФУК + ГВК + 3-МТ/ДА) не отличался от динамики изменений в группах контрольных мышей, при этом четко прослеживаются отличия на уровне 15 сут ПНР. Паттерн онтогенетических изменений концентраций 5-ОТ, 5-ОИУК и показателя 5-ОИУК/5-ОТ не отличался от динамики развития контрольной группы значений, при этом максимальные различия по всем указанным параметрам отмечались на 64 ПНР, когда содержание 5-ОТ и 5-ОИУК возрастало на 20–30% (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень как катехоламинов, так и серотонина в структурах мозга мышат в возрасте 15 сут существенно ниже, чем у взрослых животных (64 дня ПНР). Как известно, созревание моноаминергических систем мозга крысиного плода происходит начиная с третьего триместра беременности и охватывает первые три недели постнатального периода [15]. У крыс содержание моноаминов в центральной нервной системе при рождении составляет 8–12% от концентрации у взрослых особей [16–18]. Уровень ДА в мозге к 2-недельному возрасту соответствует примерно 50% от содержания у взрослых. К 4-недельному возрасту содержание ДА находится в пределах от 80 до 100% от значений этого параметра у взрослых крыс. Наблюдавшееся нами увеличение показателей метаболических характеристик ДА-ергической системы на 15 день ПНР можно объяснить недостаточной регуляторной активностью D2 ауторецепторов в этом возрасте. То же самое можно отнести и к серотониновой системе. Показано, что плотность D2-рецепторов при рождении колеблется в диапазоне 5–18% от плотности у взрослых [19], к концу первой недели жизни возрастает до 25–45% и к концу 2 нед. жизни достигает значений концентрации у взрослых особей [20, 21].

Введение ВН (400 мг/кг, п/к) на 12.5 день гестации самкам мышей не вызывало значительных изменений в структурах мозга потомства на 15 сут ПНР, за исключением стриатума, в котором от-

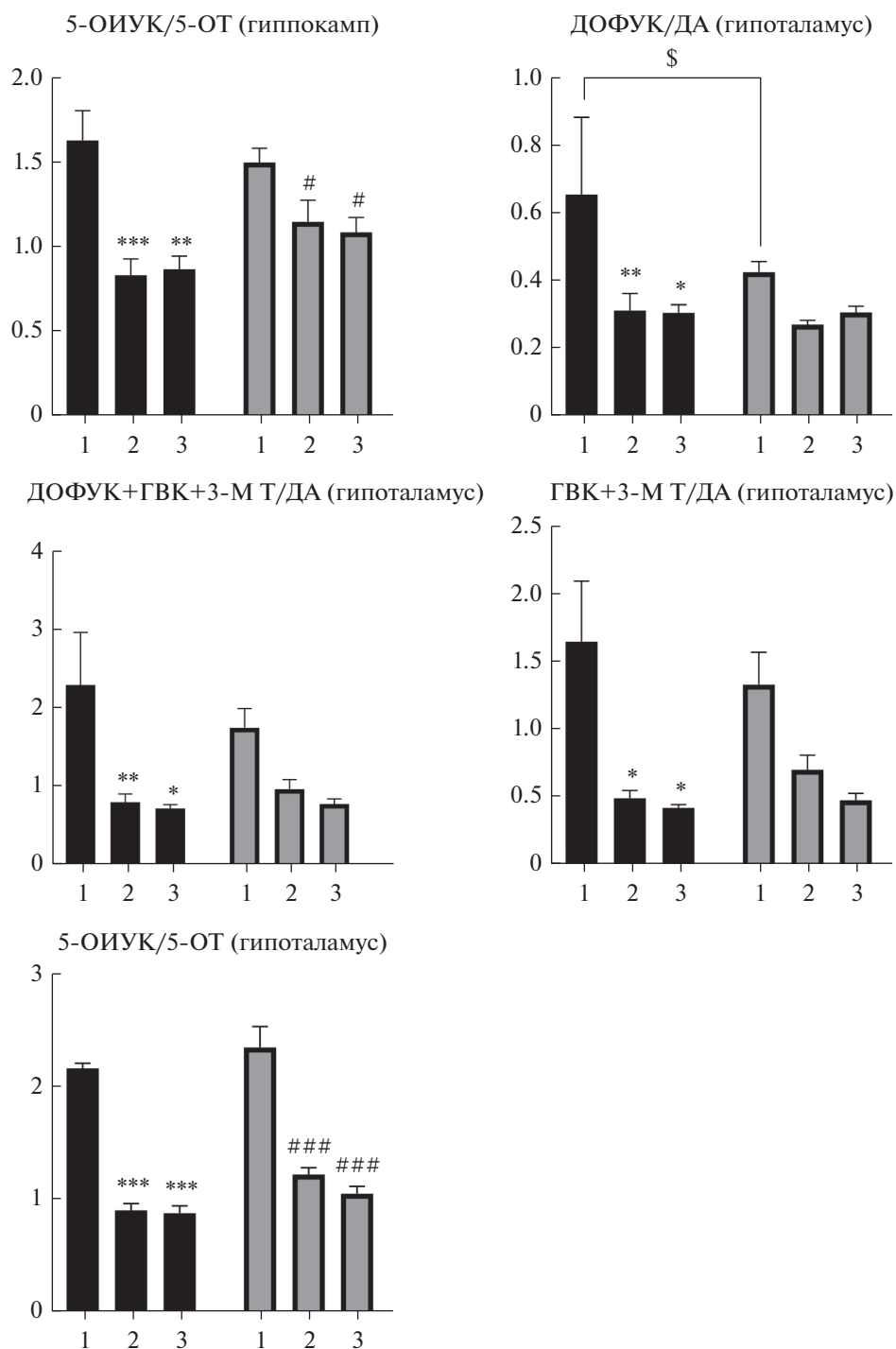


Рис. 1. Динамика изменения метаболизма моноаминов в гиппокампе и гипоталамусе мышей линии BALB/C, матерям которых вводили вальпроат натрия (400 мг/кг, п/к). Черный цвет — контроль. Серый цвет — вальпроат натрия. Цифрами обозначен возраст животных: 1 — 15 дней; 2 — 42 дня; 3 — 64 дня. *, **, *** $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 по сравнению с контролем (15 дней). #, ##, ### $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 по сравнению с вальпроатом натрия (15 дней). ^, ^^, ^^^ $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 по сравнению с вальпроатом натрия (42 дней). \$, \$\$, \$\$\$ $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 по сравнению с контролем той же возрастной группы.

мечалось снижение величины всех параметров моноаминанергической нейротрансдачи. Отличие в метаболической активности от соответствующей контрольной группы, возможно, связано со

снижением активности тирозингидроксилазы — фермента, лимитирующего скорость синтеза ДА под влиянием ВН. В дальнейшем, к 42 сут ПНР, общий паттерн изменения концентраций нейротранс-

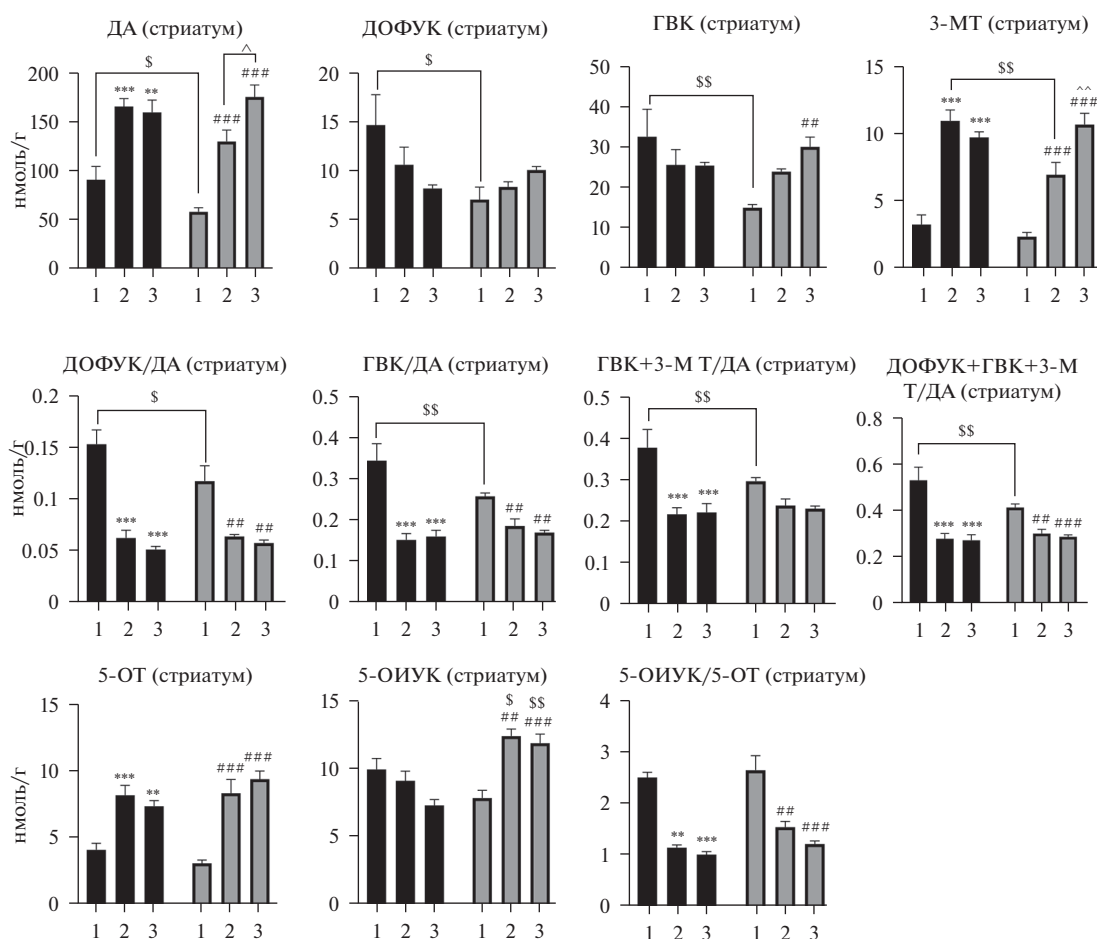


Рис. 2. Динамика изменения содержания моноаминов и их метаболитов (нмоль/г ткани) в стриатуме мышей линии BALB/C, матерям которых вводили вальпроат натрия (400 мг/кг, п/к). Черный цвет – контроль. Серый цвет – вальпроат натрия. Цифрами обозначен возраст животных: 1 – 15 дней; 2 – 42 дня; 3 – 64 дня. *, **, *** $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 по сравнению с контролем (15 дней). #, ##, ### $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 по сравнению с вальпроатом натрия (15 дней). ^, ^^, ^^ $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 по сравнению с вальпроатом натрия (42 дней). \$, \$\$, \$\$\$ $p < 0.05$; < 0.01 ; < 0.001 по сравнению с контролем той же возрастной группы.

миттеров не отличался от динамики созревания нейротрансмиттерных систем контрольной группы соответствующей стадии ПНР. Исключение составляла только концентрация серотонина и его метаболита в стриатуме, которая превышала аналогичный показатель группы “P42” контроля. К 64 дню уровни 5-ОТ и 5-ОИУК в группе мышей, получавших ВН, также были выше величин этих параметров в стриатуме мышей контрольной группы. Уровень катехоламиновых нейротрансмиттеров изменялся в онтогенетическом развитии значительно медленнее, при этом существенных отличий параметров мышей групп, пренатально получавших ВН, от показателей контроля не наблюдалось, за исключением содержания ДА, значительно возросшего в стриатуме в период с 42 по 64 день, тогда как в группе контроля уровень ДА в этот промежуток времени увеличивался более плавно.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предполагать, что введение ВН беременным самкам отражается, в первую очередь, на функциональном состоянии дофаминергической системы мозга потомства, вызывая снижение ее активности в стриатуме к 15 сут ПНР. В дальнейшем уровень ДА компенсируется и к 64 сут не отличается от показателей контрольной группы. Параметры серотонинергической системы изменяются по сходной схеме, однако содержание 5-ОТ достигало максимума к 42 дню с последующим небольшим снижением к 64 дню, тогда как уровень 5-ОИУК в стриатуме увеличивался постепенно, и максимальные отличия наблюдались к 64 дню ПНР, т.е. к возрасту половой зрелости.

Следует отметить, что большая часть существующих публикаций, посвященных исследованию вальпроатной модели аутизма, касается либо изучения электрофизиологических параметров

нейронов [22], либо определения содержания нейротрансмиттеров в микродиализных образцах [23]. Комплексное изучение влияния ВН на содержание моноаминов и их метаболитов в различных структурах мозга до настоящего времени практически не проводилось. Однако сравнительно недавно появился ряд работ, выполненных коллективом Нага и соавторов, посвященных изучению влияния ВН на параметры ДА-ергической нейротрансмиттерной системы [24]. Если на первых этапах исследования эффекты ВН на содержание ДА, НА и 5-ОТ в ПФК и стриатуме не наблюдались [25], то в дальнейшем ими было продемонстрировано снижение активности ДА-ергической системы префронтальной коры в условиях данной модели [26]. При этом было обнаружено, что как острое, так и хроническое введение атипичных нейролептиков рисперидона и арипразола потомству самок, которым вводили ВН, вызывает ослабление социальной изоляции на поведенческом уровне, а также увеличение внеклеточного содержания ДА и возрастание экспрессии гена *C-fos* в префронтальной коре [27]. В то же время влияние ВН на динамику изменений активности нейротрансмиттерных систем мозга в онтогенезе практически до настоящего времени не изучалось. Только недавно (6.2020) появилась работа Adam et al., посвященная иммуноцитохимическому и морфологическому гистохимическому изучению состояния дофаминергической системы мозга потомства самок мышей возрастом 7 дней, получавших ВН [28]. При этом было показано отсутствие каких-либо изменений содержания ДА в структурах нигростриарной системы (вентральная область покрышки, дорсолатеральный стриатум) при существенном уменьшении количества дофаминсодержащих нейронов в образованиях, относящихся к мезолимбической системе (прилежащее ядро). По всей видимости, срок между 7 и 15 днями ПНР является ключевым для проявления изменений активности стриатной дофаминергической системы, вызванной ВН.

Таким образом, результаты наших экспериментов представляют определенный интерес и могут использоваться для разработки стратегии фармакотерапии аутистических расстройств.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках бюджетной тематики ФГБНУ “НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова” (тема № 0521-2019-0007: Разработка средств лечения эпилепсии, болезни Паркинсона и аутизма на основе новых данных патогенеза заболеваний).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01.04.2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29.08.2014 г. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” (протокол №6 от 16.04.2018 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moreno-Fuenmayor H., Borjas L., Arrieta A., Valera V., Socorro-Candanoza L. // *Invest Clin.* 1996. V. 37. № 2. P. 113–28.
2. Shimmura C., Suda S., Tsuchiya K.J., Hashimoto K., Ohno K., Matsuzaki H., Iwata K., Matsumoto K., Wakuda T., Kameno Y., Suzuki K., Tsujii M., Nakamura K., Takei N., Mori N. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10. P. E25340.
3. Adamsen D., Meili D., Blau N., Thöny B., Ramaekers V. // *Mol. Genet. Metab.* 2011. V. 102. № 3. P. 368–73.
4. Devlin B., Cook E.H. Jr., Coon H., Dawson G., Grigorenko E.L., McMahon W., Minshew N., Pauls D., Smith M., Spence M.A., Rodier P.M., Stodgell C., Schellenberg G.D. // *Mol. Psychiatry.* 2005. V. 10. № 12. P. 1110–1116.
5. Kistner-Griffin E., Brune C.W., Davis L.K., Sutcliffe J.S., Cox N.J., Cook E.H. Jr. // *Am. J. Med. Genet. B (Neuropsychiatr. Genet.).* 2011. V. 156. № 2. P. 139–144.
6. Margoob M.A., Mushtaq D. // *Indian J. Psychiatry.* 2011. V. 53. № 4. P. 289–299.
7. Castelli M., Nigrelli D., Gorina A.S., Laumonnier F., Bertolino G. // *Rivista di Psichiatria.* 2000. V. 40. № 5. P. 39–44.
8. Aman M.G., Kern R.A. // *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 1989. V. 28. P. 549–565.
9. Martineau J., Barthelemy C., Jouve J., Muh J.P., Lelord G. // *Dev. Med. Child. Neurol.* 1992. V. 34. № 7. P. 593–603.
10. Горина А.С., Колесниченко Л.С. // *Международн. Журн. по иммунореабилитации.* 1999. № 5. С. 119–123.
11. Горина А.С., Колесниченко Л.С., Михнович В.И. // *Биомед. Химия.* 2011. Т. 57. № 5. С. 562–570.
12. Narita N., Kato M., Tazoe M., Miyazaki K., Narita M., Okado N. // *Pediatr. Res.* 2002. V. 52. № 4. P. 576–579.
13. Bossu J.L., Roux S. // *Med Sci (Paris).* 2019. V. 35. № 3. P. 236–243.
14. Lee T., Gorzalka B. // *Neurosci.* 2012. V. 204. P. 17–30.
15. Надорова А.В., Колик Л.Г., Клодт П.М., Наркевич В.Б., Наплекова П.Л., Козловская М.М., Кудрин В.С., Середенин С.Б. // *Нейрохимия.* 2014. Т. 31. № 2. С. 1–7.
16. Druse M.J., Tajuddin N., Kuo A. // *J. Neurosci. Res.* 1990. V. 27. № 2. P. 233–240.
17. Herrregodts P., Velkeniers B., Ebinger G., Michotte Y., Vanhaelst L., Hooghe-Peters E. // *J. Neurochem.* 1990. № 55. P. 774–779.

18. *Lajtha N.S.* // In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. 3rd ed. / Eds. Lajtha N.S., Johnson A., Dianna A. N.Y., 2007.
19. *Brady S.* // In: Basic Neurochemistry Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology. 8th Ed. / Eds. Brady S., Siegel G., Wayne Albers R., Price D. Oxford, 2012.
20. *Jung A.B., Bennett J.P.* // Dev. Brain Res. 1996. № 94. P. 109–120.
21. *Schambra U.B., Duncan G.E., Breese G.R., Fornaretto M.G., Caron M.G., Frembeau R.T. Jr.* // J. Neurosci. 1994. V. 62. № 1. P. 65–85.
22. *Antonopoulos J., Dori I., Dinopoulos A., Chiotelli M., Parnavelas J.G.* // Neurosci. 2002. V. 110. № 2. P. 245–256.
23. *Brumback A.C., Ellwood I.T., Kjaerby C., Iafrati J., Robinson S., Lee A.T., Patel T., Nagaraj S., Davatolhagh F., Sohal V.S.* // Mol. Psychiatry. 2018. V. 23. № 10. P. 2078–2089.
24. *Nakasato A., Nakatani Y., Seki Y., Tsujino N., Umino M., Arita H.* // Brain Res. 2008. V. 1193. P. 128–135.
25. *Hara Y.* // Yakugaku Zasshi. 2019. V. 139. № 11. P. 1391–1396.
26. *Hara Y., Takuma K., Takano E., Katashiba K., Taruta A., Higashino K., Hashimoto H., Ago Y., Matsuda T.* // Behav. Brain Res. 2015. V. 289. P. 39–47.
27. *Hara Y., Ago Y., Taruta A., Hasebe Sh., Kawase H., Tanabe W., Tsukada Sh.* // Psychopharmacol. (Berlin). 2017. V. 234. P. 3217–3228.
28. *Adam A., Kemecei R., Company V., Murcia-Ramon R., Juarez I., Gerecsei L.I., Zachar G., Echevarria D., Puellas E., Martinez S., Csillag A.* // Front. Neuroanat. 2020.

The Neurochemical Study of the Dynamics of Disturbances of Brain Monoaminergic Systems Induced by Valproic Acid at the Different Stages of Ontogeny of BALB/c Mice

**V. S. Kudrin^a, V. B. Narkevich^a, A. A. Alymov^a, I. G. Kapitsa^a,
K. A. Kasabov^a, N. V. Kudryashov^a, V. G. Konkov^a, and T. A. Voronina^a**

^a*Zakusov's State Institute of Pharmacology, Moscow, Russia*

We studied the status of dopamine-, serotonin-, and noradrenergic neurotransmitter systems of BALB/c mice brain structures on 15, 42 and 64 days of postnatal development in the model of autistic disturbances. The levels of catechol- as well as indolamines in the structures studied of 15- days old pups of control group were found to be sufficiently lower compared to those of 64-days old adult males. Injection of valproic acid (400 mg/kg, s/c) to pregnant females induced a decrease in all the neurochemical parameters studied only in the striatum while no changes in the other brain structures were observed. The pattern of the recovery of the dopaminergic system on the 42 day was similar to that of control group and on the 64 day no difference with control was found. Parameters of the serotonergic system changed similarly, 5-HT content reached the maximum value on the day 42 with a slight decrease on the day 64, while the concentration of 5-HIAA increased gradually up to 64 day. Thus, the data obtained suggest that injection of sodium valproate to pregnant BALB/c mice females invoke the suppression of the activity of the dopamine- and serotonergic striatal systems of the 15 day-old progeny with the subsequent recovery to control levels on the 64 day of ontogeny.

Keywords: autism spectrum disorders, valproic acid, BALB/c mice, ontogeny, HPLC, dopamine, serotonin, metabolites

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 615.21+612.014

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АФОБАЗОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ МОНОАМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА СЕРТОНИНА В СТРУКТУРАХ МОЗГА МЫШЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ ЭМОЦИОНАЛЬНЫМ ФЕНОТИПОМ

© 2021 г. В. Б. Наркевич¹ *, С. А. Литвинова¹, В. С. Роговский¹, И. Б. Цорин¹, В. С. Кудрин¹

¹ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.

После доработки 27.07.2020 г.

Принята к публикации 29.07.2020 г.

Проведено изучение нейрoхимических эффектов афобазола в структурах мозга линий мышей BALB/C и C57BL/6 в условиях дефицита серотонина, вызванного введением парахлорфенилаланина (ПХФА), ингибирующего основной фермент синтеза серотонина триптофан-5-гидроксилазу. Установлены межлинейные различия в уровне норадреналина (НА), серотонина (5-ОТ), а также параметров метаболизма дофамина (ДА) во фронтальной коре (ФК), амигдале, стриатуме, гипоталамусе и гиппокампе. Установлено, что ПХФА (350 мг/кг/3 дня) вызывал значительное снижение содержания 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК в исследуемых структурах головного мозга у обеих линий мышей, при этом у мышей BALB/C наблюдалось более интенсивное (в 2–2.5 раза) снижение этих показателей. ПХФА снижал уровень НА в гипоталамусе, амигдале и стриатуме у грызунов линии BALB/C, не влияя на данный показатель у мышей линии C57BL/6. Афобазол (5 мг/кг) в условиях моделирования дефицита 5-ОТ оказывал влияние на параметры дофаминергической нейротрансмиссии, снижая содержание ДОФУК и величину показателя ДОФУК/ДА в гипоталамусе и стриатуме мышей обеих линий. Наблюдалось увеличение содержания 5-ОТ и НА, сниженных в результате введения ПХФА, в гипоталамусе и амигдале мышей BALB/C и в гиппокампе и амигдале мышей линии C57BL/6. Величина показателей скорости метаболизма 5-ОИУК/5-ОТ при этом снижалась. Результаты данной работы подтверждают полученные ранее данные об участии серотонинергических систем мозга в механизме действия афобазола. В условиях ПХФА-индуцированного дефицита серотонина препарат воздействует как на стрессоустойчивых (линия C57BL/6), так и на более эмоционально лабильных животных (линия BALB/C), что выражается в восстановлении содержания серотонина и норадреналина в гипоталамусе мышей BALB/C, а также амигдале и гиппокампе мышей линии C57BL/6.

Ключевые слова: афобазол, парахлорфенилаланин (ПХФА), линии мышей, структуры мозга, серотонин, норадреналин, дофамин, ВЭЖХ

DOI: 10.31857/S1027813321010088

ВВЕДЕНИЕ

Моделирование дефицита нейротрансмиттеров у животных, фенотипически отличающихся чувствительностью к стрессу, является одним из наиболее часто используемых методов изучения роли моноаминергических систем головного мозга при тревожных состояниях и механизма действия соединений анксиолитического профиля. Основным подходом моделирования дефицита серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) в мозге является ингибирование ключевого фермента синтеза се-

ротонина триптофан-5-гидроксилазы (ТН2) с помощью необратимых ингибиторов пара-хлорфенилаланина (ПХФА) или фенклонина, а также алиментарный прием смеси аминокислот, лишенных триптофана, что приводит к быстрому опустошению запасов 5-ОТ в организме и, в конечном итоге, к значительному снижению содержания данного нейротрансмиттера [1]. Мыши линии BALB/C, отличающиеся от животных линии C57BL/6 пассивной реакцией на моделирование стрессовой ситуации в открытом поле [2], имеют мутацию в гене, кодирующем ТН2, что определяет более низкий базовый уровень и скорость синтеза серотонина в мозге этих животных [3–5].

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, Балтийская ул., 8, тел. (495) 601-21-53; e-mail: narvik@yandex.ru.

Афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этил-тио]-бензимидазола дигидрохлорид), синтезированный в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, обладает высоким анксиолитическим потенциалом. Механизм анксиолитического действия афобазола связывают с его способностью взаимодействовать с σ_1 (сигма) рецепторами, рецепторами мелатонина MT_1 и MT_3 , а также регуляторным участком МАО-А, оказывая модулирующее влияние на основные нейромедиаторные системы мозга [6, 7]. В частности, нами было установлено наличие селективности действия афобазола в отношении различных нейромедиаторных систем мозга мышей указанных линий [8]. Кроме того, в условиях введения ингибитора декарбоксилазы ароматических кислот NSD-1015 афобазол вызывал снижение содержания ДОФУК в гипоталамусе, а также уровня ГВК в стриатуме крыс, что позволяет говорить об ингибирующем влиянии данного соединения на основной фермент биodeградации ДА моноаминоксидазу В (МАО-В) [9]. Несмотря на то, что в последнее время накоплен значительный объем данных о фармакологических эффектах афобазола, остается по-прежнему мало сведений о влиянии данного препарата на серотонинергическую систему, которая, как известно, играет ведущую роль в нейрoхимическом механизме развития тревожных и депрессивных расстройств.

В связи со сказанным, целью данной работы было нейрoхимическое исследование эффектов афобазола на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга линий мышей с различным эмоциональным фенотипом BALB/C и C57BL/6 в норме и в условиях дефицита 5-ОТ, вызванного введением ПХФА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Опыты проведены на самцах мышей линий C57/Bl/6 и BALB/C массой тела 20–24 г. (питомник РАН “Столбовая”), содержащихся в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. Для исключения влияния суточных биоритмов на скорость биосинтеза и метаболизма нейромедиаторов эксперименты проводили между 10 и 12 ч дня. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01.04.2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29.08.2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Ко-

миссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” (протокол № 6 от 16.04.2018 г.).

Исследуемые вещества. Афобазол (ФГБНУ “НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова”) растворяли в 0.9% NaCl и вводили в дозе 5 мг/кг внутривентриально за 1 ч до декапитации животных. ПХФА (Sigma) вводился внутривентриально в течение трех дней в дозе 150 мг/кг в первый день и 100 мг/кг в последующие дни). По литературным данным, снижение уровня серотонина, вызванное ПХФА, развивается постепенно, достигает максимума через 3 сут и сохраняется в течение 5–6 сут [10].

Схема эксперимента. Животные были разделены на следующие экспериментальные группы (в скобках – количество животных):

- 1 группа BALB/C – контроль (0.9% NaCl) ($n = 9$);
- 2 группа BALB/C – 0.9% NaCl + афобазол (5 мг/кг) ($n = 10$);
- 3 группа BALB/C – ПХФА в суммарной дозе 350 мг/кг ($n = 10$);
- 4 группа BALB/C – 0.9% NaCl + афобазол + ПХФА ($n = 10$);
- 5 группа C57BL/6 – контроль (0.9% NaCl) ($n = 10$);
- 6 группа C57BL/6 – 0.9% NaCl + афобазол (5 мг/кг) ($n = 9$);
- 7 группа C57BL/6 – ПХФА в суммарной дозе 350 мг/кг ($n = 10$);
- 8 группа C57BL/6 – 0.9% NaCl + афобазол + ПХФА ($n = 9$).

Нейрoхимические исследования. Декапитация животных осуществлялась через 60 мин после введения веществ. Структуры мозга (фронтальная кора (ФК), гиппокамп, гипоталамус, стриатум) извлекались на льду, замораживались, взвешивались и хранились в жидком азоте.

Перед экспериментами по определению содержания нейротрансмиттеров пробы размельчали в ручном гомогенизаторе Поттера (тефлон–стекло) в 1 мл 0.1 N HClO₄ с добавлением 3,4-диоксифениламина (0.5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Содержание моноаминов и их метаболитов (норадреналина (НА), дофамина (ДА), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) и 5-оксииндолилуксусной кислоты (5-ОИУК) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с

аналитической колонкой ReproSil-Pur ODS (C_{18} , 100×4 мм, 3 мкм) (Dr. Maisch, Германия) [11].

Обработку полученных данных о содержании моноаминов в структурах мозга проводили следующим образом: нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как распределение результатов измерений было близко к нормальному, статистическую значимость различий анализировали с помощью трехфакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Дункану при критическом уровне значимости $\alpha = 0.05$. Приведены средние значения и стандартные ошибки среднего ($M \pm S.E.M.$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлено содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга контрольных интактных групп линий мышей BALB/C и C57BL/6 (0.9% NaCl), не подвергавшихся внешнему воздействию.

При сравнении нейрохимических показателей двух линий животных установлено, что у мышей линии BALB/C уровень НА в ФК и гиппокампе достоверно ниже соответствующих значений этого параметра у мышей линии C57BL/6. В гипоталамусе, напротив, его содержание было достоверно выше. Уровень метаболитов дофамина ДОФУК и ГВК в гипоталамусе и амигдале чувствительных к стрессу мышей, а также содержание самого нейротрансмиттера в гипоталамусе был значительно выше уровней соответствующих значений мышей C57BL/6. Параметры серотонинергической системы мышей линии BALB/C статистически достоверно отличались от линии C57BL/6 более высоким содержанием 5-ОТ в амигдале, однако в гиппокампе его уровень был ниже (табл. 1).

Афобазол при однократном введении в дозе 5 мг/кг вызывал изменение содержания нейротрансмиттеров в структурах головного мозга мышей обеих линий, при этом большая часть этих эффектов затрагивала преимущественно функции серотонин- и норадренергической систем. В гипоталамусе, амигдале и гиппокампе мышей C57BL/6 отмечалось увеличение уровня НА, в то время как у животных BALB/C его концентрация достоверно снижалась в стриатуме и гиппокампе (табл. 2). Афобазол вызывал увеличение содержания 5-ОТ практически во всех исследуемых структурах мозга (за исключением стриатума) мышей линии C57BL/6, при этом содержание метаболита 5-ОИУК и величина показателя скорости метаболизма 5-ОТ (5-ОИУК/5-ОТ) во всех структурах достоверно снижались. Аналогичное

замедление метаболизма серотонина наблюдалось в структурах мозга (кроме амигдалы) мышей линии BALB/C, однако оно не сопровождалось накоплением самого нейротрансмиттера, напротив, отмечалось снижение его уровня в стриатуме.

Эффекты афобазола на параметры дофаминергической системы характеризовались значительным (до 264%) увеличением содержания ДА в амигдале мышей с пассивной реакцией на стресс. В той же структуре животных линии C57BL/6 также наблюдалось увеличение уровня ДА, но в существенно меньшей степени (до 145%). Было обнаружено снижение содержания ДОФУК и ГВК в стриатуме мышей с активной (на 47 и 45% соответственно) и пассивной (на 40 и 30% соответственно) реакцией на стресс (табл. 2).

Введение ПХФА в суммарной дозе 350 мг/кг в течение 3-х дней предсказуемо вызвало значительное снижение содержания 5-ОТ и 5-ОИУК в исследуемых структурах головного мозга у обеих линий мышей. Следует отметить, что у мышей с пассивной реакцией на стресс (BALB/C) наблюдалось более интенсивное снижение данных показателей — на 70–80% от значений контрольной группы, что в 2–2.5 раза было ниже показателей мышей линии C57BL/6. ПХФА значительно снижал уровень НА в гипоталамусе, амигдале и стриатуме у чувствительных к стрессу мышей, не влияя на данный показатель у мышей линии C57BL/6. Величины параметров дофаминергической передачи при этом практически не изменялись в структурах мозга обеих линий мышей (табл. 2).

Афобазол в условиях моделирования дефицита серотонина путем субхронического введения ПХФА оказывал влияние на параметры дофаминергической нейротрансдачи. В гипоталамусе и стриатуме мышей BALB/C и C57BL/6 отмечалось снижение содержания ДОФУК и оборота ДА, показателя ДОФУК/ДА. Наибольший интерес представляют данные о влиянии афобазола на содержание 5-ОТ и 5-ОИУК. Показано, что афобазол вызывал увеличение содержания 5-ОТ, сниженно-го в результате введения ПХФА, в гипоталамусе мышей с пассивной реакцией на стресс (BALB/C) и во ФК, амигдале, гиппокампе у устойчивых к стрессу мышей (C57BL/6). Величина показателей скорости метаболизма 5-ОИУК/5-ОТ снижалась в ФК, гипоталамусе и амигдале обеих линий мышей в сходной степени. Однако уровень восстановления афобазолом дефицита серотонина был выше у мышей линии C57BL/6. Существенное увеличение содержания НА, сниженного ПХФА, отмечалось в амигдале и гиппокампе мышей линии C57BL/6 и гипоталамусе стресс-чувствительных мышей.

Таблица 1. Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга интактных мышей линий C57/Bl и BALB/C

Линии животных	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	5-ОТ	5-ОИУК	5-ОИУК/5-ОТ
Фронтальная кора									
C57/Bl	2.97 ± 0.11**	0.88 ± 0.08	0.52 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.09	9.50 ± 0.30	1.18 ± 0.06*	0.07 ± 0.01
BALB/C	2.04 ± 0.15	0.86 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.58 ± 0.01	0.64 ± 0.03	0.68 ± 0.02	8.93 ± 0.80	0.98 ± 0.10	0.11 ± 0.00
Гипоталамус									
C57/Bl	5.12 ± 0.18*	1.15 ± 0.09*	0.51 ± 0.03*	0.53 ± 0.05*	0.46 ± 0.03	0.50 ± 0.07	21.63 ± 1.07	3.12 ± 0.18	0.14 ± 0.01
BALB/C	7.28 ± 0.42	1.87 ± 0.13	0.77 ± 0.04	0.83 ± 0.11	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.05	24.28 ± 1.75	3.41 ± 0.31	0.14 ± 0.00
Амигдала									
C57/Bl	4.15 ± 0.20	4.17 ± 0.87	1.20 ± 0.11*	1.16 ± 0.23*	0.33 ± 0.06	0.26 ± 0.03	32.50 ± 1.89*	3.07 ± 0.30	0.09 ± 0.01
BALB/C	4.49 ± 0.55	7.97 ± 1.64	2.21 ± 0.37	2.64 ± 0.55	0.28 ± 0.08	0.302 ± 0.06	44.49 ± 3.94	3.88 ± 0.36	0.08 ± 0.01
Стриатум									
C57/Bl	0.59 ± 0.05	48.89 ± 2.82	2.33 ± 0.20	3.73 ± 0.26*	0.05 ± 0.00**	0.08 ± 0.00**	2.62 ± 0.12	1.21 ± 0.07	0.47 ± 0.03
BALB/C	0.87 ± 0.15	37.44 ± 5.43	2.98 ± 0.55	6.12 ± 1.12	0.06 ± 0.00	0.13 ± 0.01	3.30 ± 0.55	1.48 ± 0.32	0.44 ± 0.03
Гиппокамп									
C57/Bl	2.18 ± 0.11**	0.44 ± 0.08	0.29 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.77 ± 0.118	0.37 ± 0.10	4.87 ± 0.22	2.09 ± 0.17	0.43 ± 0.03
BALB/C	1.424 ± 0.17	0.38 ± 0.04	0.27 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.65 ± 0.064	0.50 ± 0.12	3.30 ± 0.46*	1.80 ± 0.30	0.50 ± 0.03

Примечание: приведены средние значения и стандартные ошибки ($M \pm S.E.M.$).
* достоверность отличий при $p < 0.05$ (трехфакторный анализ с переходом на множественные сравнения по Дункану).

Таблица 2. Влияние ПХФА (350 мг/кг, 3 дня) и афобазола (5 мг/кг, 60 мин) на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей линий C57/Bl и BALB/C

Вещество	НА	ДА	ДОФУК	ГВК	ДОФУК/ДА	ГВК / ДА	5-ОТ	5-ОИУК	5-ОИУК/ 5-ОТ
Фронтальная кора									
C57/Bl	Афобазол	3.35 ± 0.13	0.84 ± 0.05	0.59 ± 0.07	0.29 ± 0.07	0.71 ± 0.08	11.73 ± 0.62*	0.82 ± 0.05**	0.07 ± 0.00**
	ПХФА	2.77 ± 0.08	0.75 ± 0.06	0.48 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.64 ± 0.02	5.89 ± 0.37**	0.48 ± 0.04**	0.08 ± 0.00**
	Аф + ПХФА	2.81 ± 0.20	0.74 ± 0.11	0.45 ± 0.04	0.52 ± 0.14	0.55 ± 0.03	8.08 ± 0.58[#]	0.40 ± 0.07**	0.05 ± 0.01**[#]
BALB/C	Афобазол	1.83 ± 0.11	0.84 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.70 ± 0.03	6.69 ± 0.55*	0.58 ± 0.04**	0.09 ± 0.01
	ПХФА	1.74 ± 0.14	0.69 ± 0.10	0.56 ± 0.07	0.44 ± 0.06	0.84 ± 0.06*	2.58 ± 0.28**	0.22 ± 0.03**	0.09 ± 0.01*
	Аф + ПХФА	1.83 ± 0.08	0.78 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.52 ± 0.05^{##}	2.65 ± 0.24**	0.13 ± 0.02**	0.05 ± 0.01**[#]
Гипоталамус									
C57/Bl	Афобазол	6.32 ± 0.40*	1.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04*	0.40 ± 0.08	0.28 ± 0.03*	26.38 ± 1.08*	2.32 ± 0.11*	0.09 ± 0.00**
	ПХФА	4.69 ± 0.17	1.20 ± 0.07	0.49 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.41 ± 0.02	12.10 ± 1.24**	1.07 ± 0.14**	0.09 ± 0.00**
	Аф + ПХФА	5.48 ± 0.17	1.19 ± 0.09	0.27 ± 0.04^{##}	0.55 ± 0.14	0.24 ± 0.03^{##}	16.70 ± 1.93**	0.94 ± 0.11**	0.06 ± 0.01[#]
BALB/C	Афобазол	6.93 ± 0.51	1.84 ± 0.17	0.63 ± 0.06	0.57 ± 0.07	0.35 ± 0.03	21.91 ± 1.65	2.26 ± 0.26*	0.10 ± 0.00**
	ПХФА	5.56 ± 0.17*	1.48 ± 0.07**	0.55 ± 0.02**	0.62 ± 0.04	0.37 ± 0.02	5.70 ± 0.23**	0.44 ± 0.05**	0.08 ± 0.01**
	Аф + ПХФА	6.65 ± 0.38[#]	1.74 ± 0.09	0.27 ± 0.03[#]	0.56 ± 0.06*	0.20 ± 0.04^{##}	7.20 ± 0.43^{##}	0.36 ± 0.04*	0.05 ± 0.01**[#]
Амигдала									
C57/Bl	Афобазол	5.67 ± 0.27*	6.08 ± 0.80	1.21 ± 0.06	1.07 ± 0.15	0.23 ± 0.04	46.18 ± 1.56*	2.33 ± 0.15	0.05 ± 0.00**
	ПХФА	3.76 ± 0.31	5.85 ± 2.14	1.20 ± 0.21	1.30 ± 0.35	0.29 ± 0.04	19.66 ± 1.30*	0.94 ± 0.13**	0.05 ± 0.01**
	Аф + ПХФА	5.32 ± 0.28[#]	4.12 ± 0.52	1.03 ± 0.08	1.15 ± 0.13	0.24 ± 0.03	31.19 ± 2.38[#]	0.78 ± 0.11**	0.02 ± 0.00^{##}
BALB/C	Афобазол	5.05 ± 0.75	21.05 ± 3.22**	2.10 ± 0.26	2.77 ± 0.33	0.11 ± 0.01*	38.28 ± 2.14	2.74 ± 0.19*	0.07 ± 0.00
	ПХФА	2.21 ± 0.16**	5.81 ± 1.11	1.05 ± 0.06**	1.49 ± 0.21*	0.22 ± 0.03	11.51 ± 0.70**	0.29 ± 0.05**	0.02 ± 0.00**
	Аф + ПХФА	4.04 ± 0.27[#]	9.36 ± 1.85	0.96 ± 0.08**	0.88 ± 0.19**	0.13 ± 0.03*	16.70 ± 1.58**	0.20 ± 0.08**	0.01 ± 0.00^{##}
Стриатум									
C57/Bl	Афобазол	0.80 ± 0.08	54.21 ± 2.63	1.23 ± 0.07**	2.07 ± 0.18**	0.02 ± 0.00**	2.83 ± 0.32	0.70 ± 0.09*	0.25 ± 0.01**
	ПХФА	0.89 ± 0.13	49.50 ± 4.18	2.58 ± 0.24	3.94 ± 0.29	0.05 ± 0.00	1.66 ± 0.15**	0.36 ± 0.07**	0.21 ± 0.03**
	Аф + ПХФА	0.71 ± 0.07	58.20 ± 2.49	0.97 ± 0.08^{##}	3.46 ± 0.47	0.02 ± 0.00^{##}	1.94 ± 0.11*	0.34 ± 0.08**	0.17 ± 0.04**
BALB/C	Афобазол	0.43 ± 0.05*	43.64 ± 1.79	1.77 ± 0.05*	4.22 ± 0.20**	0.04 ± 0.00**	2.04 ± 0.14*	0.68 ± 0.05*	0.34 ± 0.03*
	ПХФА	0.51 ± 0.05*	38.12 ± 1.46	2.19 ± 0.10*	5.12 ± 0.17*	0.06 ± 0.00*	0.82 ± 0.06**	0.10 ± 0.02**	0.13 ± 0.03**
	Аф + ПХФА	0.52 ± 0.09	35.50 ± 3.40	0.67 ± 0.09^{##}	2.06 ± 0.22^{##}	0.02 ± 0.00^{##}	0.49 ± 0.12**	0.17 ± 0.13**	0.08 ± 0.02**
Гиппокамп									
C57/Bl	Афобазол	2.82 ± 0.08*	0.40 ± 0.05	0.23 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.64 ± 0.08	6.66 ± 0.20**	1.68 ± 0.08	0.25 ± 0.02*
	ПХФА	1.96 ± 0.10	0.54 ± 0.10	0.27 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.63 ± 0.12	2.50 ± 0.37**	0.41 ± 0.08**	0.15 ± 0.02**
	Аф + ПХФА	2.46 ± 0.09[#]	0.49 ± 0.07	0.42 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.96 ± 0.14	4.43 ± 0.37[#]	0.51 ± 0.10**	0.11 ± 0.01**
BALB/C	Афобазол	1.03 ± 0.05*	0.65 ± 0.10	0.30 ± 0.07	0.35 ± 0.15	0.37 ± 0.11	2.90 ± 0.34	1.01 ± 0.10**	0.36 ± 0.02*
	ПХФА	1.30 ± 0.18	0.45 ± 0.06	0.29 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.76 ± 0.10	0.74 ± 0.13**	0.22 ± 0.06**	0.29 ± 0.07*
	Аф + ПХФА	1.34 ± 0.09	0.47 ± 0.07	0.39 ± 0.08	0.11 ± 0.02	1.02 ± 0.22	0.84 ± 0.18**	0.07 ± 0.02*	0.17 ± 0.09**

Примечание: приведены средние значения и стандартные ошибки ($M \pm S.E.M.$).* достоверность различий по сравнению с контролем соответствующей линии мышей при $p < 0.05$.** при $p < 0.001$ (трехфакторный анализ с переходом на множественные сравнения по Дункану).# достоверность различий по сравнению с группой, получавшей ПХФА при $p < 0.05$;## при $p < 0.001$ (трехфакторный анализ с переходом на множественные сравнения по Дункану).

Наблюдавшееся нами снижение содержания 5-ОТ в структурах головного мозга мышей BALB/C и C57BL/6 (табл. 2) согласуется с данными литературных источников, согласно которым субхроническое введение ПХФА в течение 3-х дней приводило к снижению содержания 5-ОТ на 80% от исходных значений. Этот эффект является следствием ингибирования ПХФА триптофан-5-гидроксилазы — основного фермента синтеза 5-ОТ [10, 12]. В нашем исследовании ПХФА вызывал более глубокое снижение уровня серотонина (на 80%) и его метаболита в структурах мозга мышей линии BALB/C, что свидетельствует о нарушении скорости синтеза серотонина у этих животных [13].

Данные о влиянии афобазола на параметры серотонинергической системы согласуются с результатами наших предыдущих исследований. Так, афобазол на модели нарушения синтеза серотонина при введении ингибитора декарбоксилазы ароматических кислот NSD-1015 вызывал увеличение содержания предшественника серотонина 5-окситриптофана (5-ОТФ), самого нейромедиатора и его метаболита 5-ОИУК в гипоталамусе крыс на 50, 60 и 50% соответственно, что позволяет предположить, что данный анксиолитик оказывает влияние на фермент синтеза 5-ОТФ триптофангидроксилазу [9]. В другом исследовании, проведенном нашим коллективом, совместное введение афобазола и антагониста 5-HT_{2b/2c} рецепторов SB-200646A вызывало увеличение содержания 5-ОТ и 5-ОИУК в гиппокампе мышей BALB/C, что может быть интерпретировано как позитивная модуляция эффекта анксиолитика, обусловленная блокадой серотониновых рецепторов 5-HT₂ типа и, таким образом, свидетельствовать о вовлечении указанных рецепторов в реализацию анксиолитического эффекта афобазола [14]. В настоящем исследовании в условиях дефицита 5-ОТ, вызванного ПХФА, увеличение содержания нейротрансмиттера, вызванное афобазолом, происходило за счет снижения его метаболизма, вызванного, вероятнее всего, ингибированием фермента биodeградации — моноаминоксидазы А (МАО-А) [6]. Важно отметить, что афобазол в наибольшей степени корректировал ПХФА-индуцированный дефицит 5-ОТ в структурах мозга мышей устойчивых к стрессу — линии C57BL/6, практически полностью восстанавливая его уровень в ФК, гипоталамусе и амигдале. Более умеренный эффект препарата на чувствительных к стрессу мышей линии BALB/C можно объяснить генетически детерминированным низким содержанием ферментов МАО-В и МАО-А и, возможно, триптофан-5-гидроксилазы [4–6].

Интересно отметить, что афобазол увеличивает концентрацию НА в тех же структурах мозга, в которых отмечалось и увеличение содержания 5-ОТ. В условиях ПХФА-индуцированного истощения это происходит в амигдале и гиппокампе мышей линии C57BL/6 и в гипоталамусе мышей линии BALB/C, а в условиях нормы — в амигдале, гиппокампе и гипоталамусе стресс-устойчивых мышей. Подобное увеличение концентрации норадреналина и серотонина в синаптической щели вызывают практически все антидепрессанты различной структуры. В частности, антидепрессант мirtазапин, блокируя альфа-2 рецепторы норадреналина, по принципу отрицательной обратной связи повышает содержание в синаптической щели НА и 5-ОТ. В нашем эксперименте действие афобазола свидетельствует скорее об ингибировании деградации нейротрансмиттеров за счет угнетения активности фермента МАО-А. Это предположение подтверждают данные, полученные при изучении спектра рецепторного связывания афобазола [6].

Влияние афобазола на показатели дофаминергической нейротрансмиссии согласуется с данными, полученными нами ранее. В частности, было показано, что афобазол в условиях введения ингибитора декарбоксилазы ароматических кислот NSD-1015 вызывает снижение содержания ДОФУК в гипоталамусе, а также уровня ГВК в стриатуме крыс, что может говорить об ингибирующем влиянии первого на основной фермент биodeградации ДА моноаминоксидазу В (МАО-В) [9]. В данной работе эффекты афобазола на содержание метаболитов дофамина ДОФУК и ГВК в гипоталамусе и стриатуме обеих линий мышей также могут объясняться сходным образом — введение афобазола приводит к замедлению утилизации ДА.

Что касается межлинейных отличий поведенческих эффектов афобазола на животных с различным фенотипом эмоционального реагирования, то из литературы известно о влиянии препарата лишь на определенный фенотип — у животных с наследственно детерминированной реакцией страха при эмоционально-стрессовом воздействии (линия BALB/C), у людей с индивидуально-типологическими чертами, характеризующими психическую неустойчивость к стрессорным факторам [15].

Результаты настоящей работы подтверждают полученные нами ранее данные об участии серотонинергических систем мозга в реализации эффектов афобазола и раскрывают роль адренергической системы. В условиях ПХФА-индуцированного дефицита серотонина препарат воздействует как на стрессоустойчивых, так и на эмоционально лабильных животных, что выражается в компенсаторном восстановлении содержания серотонина

во фронтальной коре, амигдале и гиппокампе мышей линии C57BL/6 и в гипоталамусе мышей BALB/C. При этом афобазол увеличивает содержание норадреналина в амигдале и гиппокампе мышей C57BL/6 и в гипоталамусе и амигдале мышей BALB/C.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках бюджетной тематики ФГБНУ “НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова” (тема № 0521-2019-0007: Разработка средств лечения эпилепсии, болезни Паркинсона и аутизма на основе новых данных патогенеза заболеваний).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01.04.2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29.08.2014 г. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” (протокол № 6 от 16.04.2018 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanchez C.L., Arrant A., Van Swearingen A., Kuhn C., Zepf F.D. // PLoS One. 2012. V. 7. № 5. P. e35916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035916>
2. Бородин П.М., Шулер Л.М., Беляев Д.К. // Генетика. 1976. Т. 12. № 12. С. 62–71.
3. Bach H., Arango V., Huang Yung-Yu, Leong Sh., Mann J.J., Underwood M.D. // J. Neurochem. 2011. V. 118. № 6. P. 1067–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07379.x>
4. Siesser W.B., Zhang X.D., Jacobsen J.P., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M. // Neurosci. Lett. 2010. V. 481. P. 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.035>
5. Zhang X.D., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. // Science. 2004. V. 305. P. 217. <https://doi.org/10.1126/science.1097540>
6. Середенин С.Б., Воронин М.В. // Эксп. Клин. Фармакол. 2009. Т. 72. № 1. С. 1–6.
7. Werling L.L., Derbez A.E., Nuwayhid S.J. // Modulation of classical neurotransmitter systems by sigma receptors. In: Sigma receptors. Chemistry, cell biology and clinical implications. Springer, 2007. P. 195–215.
8. Раевский К.С., Наркевич В.Б., Клодт П.М., Кудрин В.С. // БЭБиМ. 2012. Т. 153. № 5. С. 644–648.
9. Давыдова А.И., Клодт П.М., Кудрин В.С., Кузнецова Е.А., Наркевич В.Б. // Эксп. Клин. Фармакол. 2010. Т. 73. № 3. С. 38–42.
10. Кое В.К., Weisman A.J. // Pharmacol. Exp. Ther. 1966. V. 154. P. 499–516.
11. Надорова А.В., Колик Л.Г., Клодт П.М., Наркевич В.Б., Наплекова П.Л., Козловская М.М., Кудрин В.С., Середенин С.Б. // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 2. С. 1–7.
12. Silvana C., Valina L. // PNAS. 2001. V. 98. № 3. P. 1277–1281.
13. Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Popova, N.K. // Genes, Brain Behav. 2005. V. 4. № 8. P. 482–485. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2005.00145>
14. Раевский К.С., Наркевич В.Б., Клодт П.М., Кудрин В.С. // Эксп. Клин. Фармакол. 2011. Т. 74. № 12. С. 3–7.
15. Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Бочкарев В.К., Бояришнова Т.В., Незнамов Г.Г. // Социальная и клиническая психиатрия. 2006. № 1. С. 38–45.

Study of the Neurochemical Effects of Afobazole on the Content of Monoamines and its Metabolites in the Model of Serotonin Deficiency in the Brain Structures of Mice with Different Emotional Phenotypes

V. B. Narkevich^a, S. A. Litvinova^a, V. S. Rogovsky^a, I. B. Tsorin^a, and V. S. Kudrin^a

^aZakusov's State Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

We studied the neurochemical effects of afobazole in the brain structures of two mouse strains with different emotional phenotypes BALB/C and C57BL/6 in the model of serotonin deficiency caused by the parachlorophenylalanine (PCPA), a tryptophan-5-hydroxylase inhibitor. Interstrain differences were found in the levels of norepinephrine (NA), serotonin (5-HT), as well as the parameters of dopamine metabolism (DA) in the frontal cortex (FC), amygdala, striatum, hypothalamus, and hippocampus. PCPA (350 mg/kg/3 days) was found to cause a significant decrease in the content of 5-HT and its metabolite 5-HIAA in the brain structures of both mice lines, while a decrease in these parameters in BALB/C mice was more intense (2–2.5 times). PCPA reduced the level of NA in the hypothalamus, amygdala and striatum in rodents of the BALB/C strain, without effects on this parameter in C57BL/6 mice. Afobazole (5 mg/kg) under conditions of 5-HT deficiency modeling influenced dopaminergic neurotransmission parameters, decreasing the

DOPAC content and the DOPAC/DA index in the hypothalamus and striatum of mice of both lines. Afobazole also caused an increase in the content of 5-HT and NA, reduced as a result of PCPA administration, in the hypothalamus of BALB/C mice and in the hippocampus and amygdala of C57BL/6 mice. The value of the metabolic rate of 5-HIAA/5-HT decreased. Our results confirm the previously obtained data on the involvement of serotonergic brain systems in the mechanism of action of afobazole. Under conditions of PCPA-induced serotonin deficiency, the drug acts on both stress-resistant and more emotionally labile animals, which is reflected in the restoration of serotonin and norepinephrine in the hypothalamus of BALB/C mice, as well as amygdala and hippocampus of C57BL/6 mice.

Keywords: afobazole, parachlorophenylalanine (PCPA), mice strains, brain structures, serotonin, norepinephrine, dopamine, HPLC

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.2+616.8-092+612.821(082)

НЕЙРОГЕНЕЗ В ГИППОКАМПЕ, ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ И ПОВЕДЕНИЕ СТАРЕЮЩИХ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НАТИВНОГО БЕЛКА α -СИНУКЛЕИНА

© 2021 г. В. В. Шерстнев¹, О. А. Соловьева¹, М. А. Грудень^{1, *},
А. М. Ратмиров¹, Е. В. Коновалова¹

¹ФГБНУ “Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.09.2020 г.

После доработки 07.11.2020 г.

Принята к публикации 13.11.2020 г.

Исследованы эффекты интраназально введенного нативного белка α -синуклеина, гиперпродукцию и мисфолдинг которого рассматривают в качестве ключевого звена патогенеза болезни Паркинсона и других возрастзависимых нейродегенеративных заболеваний, на нейрогенез в гиппокампе, содержание дофаминергических нейронов в черной субстанции мозга, а также двигательную активность, обучение, память и тревожность стареющих животных. Опыты проводили на 12-месячных самцах мышей C57BL/6, которым в течение 14-ти дней один раз в сутки вводили раствор рекомбинантного нативного α -синуклеина либо физиологический раствор. Для оценки показателей поведения использовали тесты: “Открытое поле”, “Распознавание нового объекта”, “Условная реакция пассивного избегания” и “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Пролиферирующие клетки, незрелые нейроны и дофаминергические нервные клетки выявляли иммуногистохимическим методом с помощью антител к бромдезоксидеуридину, даблкортину и тирозин-гидроксилазе. Показано, что α -синуклеин вызывает значительное увеличение количества пролиферирующих клеток и снижение числа незрелых нейронов в зубчатой фасции гиппокампа, а также снижение плотности дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции мозга. У мышей, получивших нативный α -синуклеин, выявлено снижение скорости двигательной активности, нарушение долговременной ассоциативной памяти и изменения тревожноподобного поведения. Выполнен сравнительный анализ данных, полученных в работе, и результатов ранее выполненных нами исследований эффектов олигомеров и фибрилл α -синуклеина в условиях аналогичного экспериментального протокола. Документированные факты рассматриваются как экспериментальное свидетельство вовлеченности нарушений постнатального нейрогенеза в развитие синуклеопатий и подтверждают представление о том, что различные конформации α -синуклеина обуславливают формирование определенных видов этих нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: α -синуклеин, нейрогенез, дофаминергические нейроны, гиппокамп, черная субстанция, поведение, память, мышцы, старение, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S1027813321010131

ВВЕДЕНИЕ

Представление о том, что нарушение постнатального нейрогенеза играет важную роль в инициации и развитии болезни Паркинсона (БП) и других синуклеопатий — группы возрастзависимых нейродегенеративных заболеваний, ключевым звеном патогенеза которых является гиперпродукция и мисфолдинг белка α -синуклеина (α -син) с образованием нейротоксических амиллоидогенных форм белка, находит весомые клинические и экспериментальные подтверждения.

Основные факты были получены при исследовании постмортного и аутопсильного материала больных с синуклеопатиями при изучении трансгенных животных, моделирующих эти заболевания, так, у пациентов с БП и животных, воспроизводящих некоторые признаки БП, выявлены нарушения нейрогенеза в субвентрикулярной зоне, зубчатой фасции (ЗФ) гиппоампа мозга. При этом могли наблюдаться различные двигательные расстройства [1–5].

Важное значение для понимания механизмов участия и роли нейрогенеза в развитии БП и других синуклеопатий представляют данные об особенностях влияния различных конформаций α -син на процессы постнатального нейрогенеза, сопря-

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: mgruden@mail.ru.

женные с обеспечением функций, нарушения которых характерны для данных заболеваний.

Однако в настоящее время прямые экспериментальные факты об эффектах конформаций α -син на нейрогенез, двигательные, когнитивные и психо-эмоциональные функции документированы лишь в небольшом числе работ. Наименее исследовано действие нативного белка α -син. При этом полученные результаты неоднозначны и противоречивы, поскольку были использованы различные модели, виды и возраст животных, пути введения и дозы белка, а также сроки наблюдения и регистрируемые показатели [6–9]. Известно, что α -син — небольшой по размеру белок, широко распространенный в нервной системе, локализуется главным образом в пресинаптических терминалах нейронов, а также в глиальных клетках. В нормальных условиях α -син представлен в клетке преимущественно в виде тетрамера и существует в нативной и мембраносвязанной формах. Белок участвует в процессах везикулярного транспорта, стабилизации мембран, обмена и транспорта моноаминов, синаптической пластичности. Накопление α -син в нервных и глиальных клетках вызывает их апоптотическую гибель, опосредованную процессами протеолического стресса, оксидативного повреждения и митохондриальной дисфункции. В определенных условиях, в частности при повышенной концентрации α -син в клетке, происходит изменение его нативной пространственной укладки с образованием амилоидогенных нейротоксических олигомерных и фибриллярных структур [10–12]. Таким образом, в мозге одновременно могут присутствовать различные конформации α -син и вызывать гибель отдельных популяций нейронов и/или глиальных клеток, что обуславливает течение и спектр клинических проявлений, характерных для определенных видов синуклеопатий [12–14].

Ранее нами было проведено сравнительное изучение эффектов, полученных *in vitro* α -син амилоидогенных олигомерных и фибриллярных структур, выполненное на разработанной оригинальной экспериментальной модели сходных с БП нейродегенеративных состояний. Модель основана на хронической инокуляции в нос стареющим мышам нейротоксических амилоидогенных форм α -син [15, 16]. Полученные результаты показали, что изученные конформационные структуры белка α -син — олигомеры и фибриллы — характеризуются определенным паттерном активности, оказывая избирательное действие на процессы нейрогенеза в ЗФ гиппокампа, дофаминергические нейроны (ДА) компактной части черной субстанции (кЧС) мозга, кратковременную и долговременную память, а также тревожность стареющих мышей [17, 18]. В связи с изложенным, учитывая немногочисленность и противоречивость имеющихся данных, представляется важным исследовать

действие нативного α -син в условиях аналогичного экспериментального протокола, что актуально для выяснения механизмов развития синуклеопатий и разработки методов ранней диагностики этих заболеваний.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния нативного α -синуклеина при его хроническом интраназальном введении на нейрогенез в зубчатой фации гиппокампа, содержание ДА-ергических нейронов в компактной части черной субстанции мозга, двигательную активность, тревожность, долговременную и кратковременную память стареющих мышей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 15-ти самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 12-ти месяцев (ФГБУН НЦБМТ ФМБА питомник “Столбовая”, Россия). Мыши содержались по 3–5 особей в клетках в стандартных условиях вивария со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 ч при свободном доступе к пище и воде. Мыши были разделены на 2 группы, которым ежедневно в течение 14-ти дней вводили поочередно в каждую ноздрю физиологический раствор (“контрольная группа”, ФР, 8 мкл, $n = 6$) либо раствор рекомбинантного нативного α -син (“экспериментальная группа”, 8 мкл, 0.48 мг/кг, Центр Биотехнологии (Вильнюс, Литва, $n = 9$)).

В работе была использована батарея поведенческих тестов, описанная нами ранее [17, 18]. На 15-й день исследования животных из “контрольной” и “экспериментальной” групп однократно помещали в установку “Открытое поле” (ОП) (Columbus Instruments, Орайо, США) для адаптации в течение 5 мин и последующим тестированием — 6 мин). Поведение животных регистрировали с помощью видеокамеры CNB-BVB-31F (CNB Technology Inc., Корея), размещенной под потолком экспериментальной комнаты. Сбор и анализ данных проводили с помощью программы Ethovision XT 8.5 (Noldus, Голландия). Для осуществления анализа площадь установки делили на 16 равных квадрантов. По перемещению центра тела животного оценивали среднюю скорость движения, а также длительность нахождения и количество заходов в центральную зону (4 центральных квадранта из 16-ти) и углы (4 угловых квадранта). На 16-е сутки оценивали кратковременную память всех мышей в тесте “Распознавание нового объекта” (РНО), используя установку ОП как арену для проведения исследования. Во время сессии обучения длительностью 5 мин животные имели возможность свободно исследовать два идентичных объекта (банки диаметром 5.4 см из стекла с металлическими крышками). Через 1 ч после сеанса обучения проводили 5-минутную сессию тестирования мышей: в установку

помещали один, ранее знакомый, и один, новый для мыши, объект (пластмассовый стакан диаметром 7.5 см, зеленого цвета). В тесте РНО зоны интереса определяли по границам размещенных в установке 2 объектов (двух при обучении и двух при тестировании) на расстоянии 2 см от этих объектов (в пограничных зонах). Положение животного в данном тесте определяли по трем точкам (нос, центр тела и хвост), используя видеорегистрацию. Считали, что мышь исследует объект, если ее нос определялся в границах самого объекта или его пограничной зоны. По окончании экспериментов рассчитывали индекс дискриминации (ИД) = $T_{\text{нов}} / (T_{\text{нов}} + T_{\text{знак}})$, где $T_{\text{нов}}$ — длительность нахождения в зоне нового объекта и его пограничной зоне (в секундах), $T_{\text{знак}}$ — длительность нахождения в зоне знакомого объекта и его пограничной зоне (в секундах). На 18-ые сут эксперимента у животных обеих групп формировали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ) в установке PACS Shuttle Box (v.3.13) (Columbus Instruments, Огайо, США), сохранность которой оценивали через 24 ч. Животных адаптировали к освещенному отсеку 15 с, при этом максимальная длительность сессии обусловливания составляла 180 с, а сессии тестирования — 300 с. В случае перехода в темный отсек мышь получала электрокожное раздражение лап и хвоста (сила тока 0.6 мА, длительность разряда — 3 с). С помощью программного обеспечения PACS 30 Shuttle Box v.3.13 в обеих сессиях автоматически фиксировали латентное время (ЛВ) перехода из освещенного в темный отсек камеры. Через 2 дня после проведения УРПИ животных однократно в течение 5 мин тестировали в установке “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) (Columbus Instruments, Огайо, США). В ПКЛ выделяли 2 суммарные зоны интереса: 2 открытых рукава и 2 закрытых. Оценивали следующие показатели: среднюю скорость движения, суммарное количество входов и длительность пребывания в двух закрытых и двух открытых рукавах. Опыты в ОП, РНО и ПКЛ проводили в помещении при освещении установки рассеянным светом.

Через сутки после окончания поведенческих экспериментов животным внутрибрюшинно вводили 3 раза с интервалом в 60 мин раствор бромдезоксипуридина (BrdU, Sigma, США) в суммарной дозе 150 мг/кг. Спустя 24 ч после введения BrdU животных наркотизировали внутрибрюшинно препаратом “Золетил” (Virbac Sante Animale, Франция, 40 мг/кг), проводили транскардиальную перфузию 0.1 М фосфатным буфером (PBS, pH 7.4) и 4%-ным раствором параформальдегида с дополнительной фиксацией препаратов мозга в 4%-ном растворе параформальдегида. Для изготовления сагиттальных срезов левого полушария мозга контрольных и экспериментальных животных исполь-

зовали микротом Leica VT 1200S (Leica Biosystems, Германия). Полученные срезы помещали в лунки 24-луночного культурального планшета (13–15 срезов на лунку, шаг 300 мкм, толщина срезов 50 мкм). Проводили денатурацию ДНК, пермеабиллизацию мембран, снижение неспецифического связывания антител с последующей инкубацией с первичными антителами (АТ) к Guinea Pig anti-Doublecortin antibody, (AB2253, Millipore, США) (в разведении 1 : 500) и тирозингидроксилазе (Tyrosine hydroxylase, Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase антитела (MAB318, Millipore, США) (в разведении 1 : 200) по описанному ранее протоколу [10]. Далее срезы инкубировали с вторичными АТ, конъюгированными с флуоресцентными красителями в разведении 1 : 500 (Goat anti-mouse Alexa Fluor 594, A-11005, Molecular Probes, США; Goat anti-Guinea Pig Alexa Fluor 647, A-21450, Molecular Probes, США; Goat anti-Rat Alexa Fluor 488, A-11006, Molecular Probes, США). После стандартного отмывания срезы заключали под покровные стекла с использованием закрепителя для флуоресцентных препаратов (S302380, Dako, США) и хранили при температуре +4°C в темноте.

Для микроскопирования полученных препаратов использовали спиннинг-диск микроскоп Andor Revolution (Andor, Ирландия). Сканирование препаратов осуществляли на всю глубину с шагом 1 мкм, панораму всей 3Ф гиппокампа или компактной части ЧС сшивали с 10%-ным перекрытием. Количество клеток оценивали вручную на 3D-реконструированных образцах (Imaris x64 7.4.2, Bitplane, Швейцария). Содержание BrdU+ и DCX+-положительных клеток оценивали в области субгранулярного слоя 3Ф на всех срезах в отдельной лунке, экстраполируя данные на целую 3Ф [19]. TH+-положительные клетки (в мм³ ткани), считали в области Pars compacta ЧС (Bregma lateral 0.60 mm–lateral 1.32 mm по формуле $V_{\text{поверхности}} \times \times 50$ (толщина среза)/ n (количество оптических плоскостей) [20]. На графиках иммуногистохимические данные представлены в % от контроля.

Статистический анализ результатов поведенческих экспериментов осуществляли с помощью программ SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., США), Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США) и Prism 6.01 (GraphPad, США). Поведенческие данные представляли как медиану (Me) и межквартильный размах, Q3–Q1 (IQR), иммуногистохимические — как средние значения и стандартные ошибки измерения ($M \pm SEM$). Показатели сравнивали с помощью теста Манна–Уитни для двух независимых выборок и теста Вилкоксона для зависимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Таблица 1. Средняя скорость движения мышей в моделях “Открытое поле” и “Распознавание нового объекта”, а также в “Приподнятом крестообразном лабиринте”

Тесты	Нативный α -синуклеин, $n = 9$	Физиологический раствор, $n = 6$	Различия между группами, критерий Манна–Уитни
ОП, адаптация	(3.7; 3.2 см/с) 4.8 ± 0.7 см/с	(5.9; 2.5 см/с) 5.8 ± 0.5 см/с	$U = 17.0$, $Z = -1.179$, $p > 0.2$
ОП, тестирование	(3.2; 2.2 см/с) 3.5 ± 0.4 см/с	(5.1; 2.5 см/с) 5.2 ± 0.6 см/с	$U = 11.0$, $Z = -1.886$, $p = 0.059$
РНО, обучение	(3.0; 2.3 см/с) 2.9 ± 0.5 см/с	(4.0; 0.8 см/с) 4.0 ± 0.2 см/с	$U = 9.0$, $Z = -2.121$, $p = 0.034$
РНО, тестирование через 1 ч	(2.4; 1.8 см/с) 2.6 ± 0.6 см/с	(2.2; 1.1 см/с) 2.4 ± 0.3 см/с	$U = 26.0$, $Z = -0.118$, $p > 0.2$
ПКЛ	(4.5; 1.1 см/с) 4.5 ± 0.2 см/с	(5.5; 2.0 см/с) 5.8 ± 0.5 см/с	$U = 8.0$, $Z = -2.066$, $p = 0.039$

Примечание: данные представлены как медиана и межквартильный размах, среднее и стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенных поведенческих исследований было документировано, что животные, которым на протяжении 14-ти дней интраназально вводили нативный α -син, на 15-ый день исследования статистически значимо не различались от мышей, получивших ФР, по скорости движения в тесте ОП (тест Манна–Уитни, первые 5 мин тестирования: $p > 0.2$; последующие 6 мин: $p = 0.059$). При этом на 16-ый день исследования при обучении в модели РНО и на 22-ой день при тестировании в ПКЛ различия в скорости движения стали статистически значимыми ($p = 0.034$ и $p = 0.039$ соответственно) (табл. 1).

В тесте ОП животные из разных групп не различались ни по количеству заходов в центр установки (4 центральных квадранта из 16), ни по времени, проведенному в них (тест Манна–Уитни, $p > 0.2$). Обе группы мышей статистически значимо больше времени провели в углах установки и чаще заходили в них по сравнению с центральной частью (тест Вилкоксона, $p < 0.05$). Экспериментальные мыши заходили в углы установки в полтора раза реже по сравнению с контролем, однако эти различия не были статистически значимыми (табл. 2).

В тесте РНО было обнаружено, что только у 67% мышей в группе ФР и в 44% животных в экспериментальной группе уровень исследовательской активности во время сессии обучения был достаточным для оценки сохранности эпизодической памяти в последующем исследовании (медиана суммарной длительности обследования объектов у этих мышей с высоким уровнем внимания была равна 12.5 с). Различия в доле мышей с низким и высоким уровнем внимания между экспериментальными и контрольными животными

были статистически незначимы (точный критерий Фишера, $p > 0.2$), учитывая изложенные данные, мыши с низким уровнем внимания были исключены из анализа. Экспериментальные животные с высоким уровнем внимания не отличались от контроля ни по времени исследования нового объекта (>0.2), ни по времени исследования знакомого ($p > 0.2$) при тестировании, ни по уровню индекса дискриминации ($p > 0.2$) (табл. 3).

Таким образом, полученные в тесте РНО данные не позволяют оценить влияние нативного α -син при хроническом интраназальном введении на обучение и эпизодическую память стареющих самцов мышей C57Bl/6 в условиях используемого экспериментального протокола. Этот результат, возможно, связан с тем, что взрослые достаточно старые самцы мышей C57Bl/6 по сравнению с другими, широко используемыми лабораторными мышами, характеризуются более низкой способностью к обучению и сохранности памяти [21, 22].

В модели УРПИ одна мышь из группы ФР была исключена из эксперимента, поскольку не перешла в темный отсек за 2 сессии обусловливания. Между животными двух групп не было найдено достоверных различий в ЛВ перехода в темный отсек ни при формировании реакции пассивного избегания (α -син: Me = 92 с; IQR = 74.5 с, 89 ± 16 с; ФР: Me = 99 с; IQR = 49.5 с, 96 ± 13 с, $U = 20.0$, $Z = -0.334$, $p > 0.2$), ни при ее тестировании через 24 ч (α -син: Me = 209 с; IQR = 210.5 с, 187 ± 40 с; ФР: Me = 180 с; IQR = 115 с, 198 ± 31 с, $U = 21.0$, $Z = -0.205$, $p > 0.2$). Дальнейший анализ показал, что группа нативного α -син неомогенна по ЛВ перехода в темный отсек в сессии тестирования (Me = 209 с, размах 6–300 с), поэтому она была поделена на две подгруппы: “быстрых” плохо

Таблица 2. Длительность нахождения и количество заходов в центральную часть и углы установки “Открытое поле”

Тесты	Нативный α -сининуклеин, $n = 9$	Физиологический раствор, $n = 6$	Различия между группами, критерий Манна–Уитни
Длительность, первые 5 мин			
ОП, центр	(23.4; 36.6 с) 26.3 ± 6.1 с	(20.3; 26.2 с) 21.6 ± 5.6 с	$U = 23.0, Z = -0.471,$ $p > 0.2$
ОП, углы	(140.5; 33.4 с) 151.8 ± 10.7 с	(164; 87.7 с) 171.0 ± 19.2 с	$U = 23.0, Z = -0.471,$ $p > 0.2$
Различия между центром и углами, критерий Вилкоксона	$Z = -2.666,$ $p = 0.008$	$Z = -2.201,$ $p = 0.028$	
Длительность, последующие 6 мин			
ОП, центр	(17.1; 28.9 с) 25.5 ± 9.5 с	(32.2; 21с) 30.3 ± 5.7 с	$U = 17.0, Z = -1.179,$ $p > 0.2$
ОП, углы	(168.8; 112.9 с) 194.2 ± 24.1 с	(211.7; 115.1 с) 219.5 ± 23.5 с	$U = 20.0, Z = -0.825,$ $p > 0.2$
Различия между центром и углами, критерий Вилкоксона	$Z = -2.666,$ $p = 0.008$	$Z = -2.201,$ $p = 0.028$	
Количество заходов, первые 5 мин			
ОП, центр	(16; 20 раз) 16 ± 4 раза	(13; 16 раз) 14 ± 4 раза	$U = 27.0, Z = 0,$ $p > 0.2$
ОП, углы	(22; 18 раз) 25 ± 4 раза	(40; 8 раз) 39 ± 3 раза	$U = 11.5, Z = -1.828,$ $p = 0.068$
Различия между центром и углами, критерий Вилкоксона	$Z = -2.524,$ $p = 0.012$	$Z = -2.201,$ $p = 0.028$	
Количество заходов, последующие 6 мин			
ОП, центр	(11; 12 раз) 11 ± 3 раза	(12; 12 раз) 14 ± 3 раза	$U = 17.5, Z = -1.126,$ $p > 0.2$
ОП, углы	(25; 18 раз) 24 ± 4 раза	(35; 22 раза) 36 ± 5 раз	$U = 12.0, Z = -1.768,$ $p = 0.077$
Различия между центром и углами, критерий Вилкоксона	$Z = -2.670,$ $p = 0.008$	$Z = -2.201,$ $p = 0.028$	

Примечание: данные представлены как медиана и межквартильный размах, среднее и стандартная ошибка.

обучившихся мышей ($n = 4$, ЛВ в тесте: $Me = 89.5$ с; $IQR = 64.0$ с, 69 ± 21 с) и “медленных” хорошо обучившихся ($n = 5$, ЛВ в тесте: $Me = 300.0$ с; $IQR = 45.5$ с, 282 ± 18 с) ($U = 0.0, Z = -2.121, p = 0.034$). “Медленные” мыши из группы нативного α -син демонстрировали увеличение ЛВ перехода в сессии тестирования (ЛВ при формировании УРПИ: $Me = 60.0$ с; $IQR = 68.5$ с, 79 ± 18 с, тест Вилкоксона, $Z = -2.023, p = 0.043$), так же как и контрольные животные ($Me = 99.0$ с; $IQR = 49.5$ с, 96 ± 13.1 с, $Z = -2.023, p = 0.04$). Вместе с тем, “быстрые” животные не показали значимого увеличения ЛВ перехода в темный отсек при формировании УРПИ: $Me = 104.0$ с; $IQR = 106.5$ с, 101 ± 29 с, $Z = -1.095, p > 0.2$, что указывает на нарушение долговременной ассоциативной памяти в под-

группе “быстрых” животных, которым вводили нативный α -син.

При оценке тревожности мыши, получившие нативный α -син, не отличались по времени, проведенном в открытых и закрытых рукавах лабиринта, от мышей, которым вводили ФР (открытые рукава: α -син: $Me = 15.5$ с; $IQR = 10.4$ с, 17.2 ± 3.3 с; ФР: $Me = 22.4$ с; $IQR = 33.1$ с, 27.6 ± 7.4 с, $U = 17.0, Z = -0.904, p > 0.2$, закрытые рукава: α -син: $Me = 250.2$ с; $IQR = 26.9$ с, 252.4 ± 6.5 с; ФР: $Me = 232.9$ с; $IQR = 54.9$ с, 234.1 ± 6.5 с, $U = 14.0, Z = -1.291, p > 0.1$). В открытые рукава лабиринта экспериментальные мыши заходили в 2 раза реже по сравнению с контрольными, но различия не достигали уровня статистической значимости (α -син: $Me = 6$ раз; $IQR = 7.7 \pm 1$ с; ФР: $Me = 12$;

Таблица 3. Исследовательская активность мышей с высоким уровнем внимания при тестировании в модели “Распознавание нового объекта”

Показатели	Нативный α -синуклеин, $n = 4$	Физиологический раствор, $n = 4$	Различия между группами, критерий Манна–Уитни
Длительность исследования нового объекта, с	(4.7; 3.1) 4.3 ± 0.9	(3.1; 7.4) 4.5 ± 2.1	$U = 5.0, Z = -0.866,$ $p > 0.2$
Длительность исследования знакомого объекта, с	(5.0; 2.4) 4.7 ± 0.7	(2.8; 3.2) 3.6 ± 1	$U = 5.0, Z = -0.866,$ $p > 0.2$
Индекс дискриминации	(0.47; 0.33) 0.47 ± 0.09	(0.5; 0.23) 0.5 ± 0.06	$U = 8.0, Z = 0,$ $p > 0.2$

Примечание: данные представлены как медиана и межквартильный размах, среднее и стандартная ошибка.

$IQR = 6.11 \pm 1$ с, $U = 9.0, Z = -1.949, p = 0.051$). Различия в количестве заходов исследованными животными в закрытые рукава ПКЛ были также статистически незначимы (α -син: Me = 8 раз; $IQR = 5.7 \pm 1$ с; ФР: Me = 11; $IQR = 9$ с, $U = 13.5, 11 \pm 2, Z = -1.363, p > 0.1$).

В иммуногистохимических экспериментах определяли содержание пролиферирующих клеток, меченых BrdU, нейробластов и незрелых нейронов, экспрессирующих DCX в ЗФ гиппокампа, а также количество дофаминергических нейронов, меченых по TH, на 1 мм^3 ткани КЧС. В группе животных, которым вводили нативный α -син, документировано значительное увеличение (на 785%) количества BrDU+ клеток в ЗФ по сравнению с контрольными мышами ($p < 0.01$), у которых число BrdU+ клеток выявлено на уровне 166.4 ± 32.0 (рис. 1). При этом у экспериментальных мышей обнаружено достоверное снижение на 93% ($p < 0.05$) содержания DCX+ клеток в ЗФ гиппокампа по сравнению с контролем — 1450.0 ± 405.0 DCX-позитивных клеток (рис. 1). Обнаружено, что введение нативного α -син вызвало снижение количества TH положительных нейронов в КЧС головного мозга мышей на 20% в сравнении с животными, получавшими физиологический раствор (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты выполненных в работе исследований демонстрируют, что нативный α -син, вводимый интраназально в течение 14-ти дней, вызывает выраженное нарушение процессов нейрогенеза в ЗФ гиппокампа и снижение количества DA-ергических нейронов в КЧС мозга 12-месячных самцов мышей C57/bl6. Вместе с тем, у животных, получавших нативный α -син, выявлены нарушения двигательной функции, долговременной ассоциативной памяти, а также изменения тревожноподобного поведения.

Документированное в данном исследовании нарушение нейрогенеза в ЗФ гиппокампа характеризуется значительной активацией процессов пролиферации — 8-кратное увеличение количества пролиферирующих клеток, а также угнетением процессов нейрональной дифференцировки и, возможно, выживаемости вновь образованных клеток — нейрональных предшественников. Об этом свидетельствует значимое снижение числа нейробластов и незрелых нейронов на 93%. При этом следует учитывать вероятность изменения дифференцировки новых клеток по глиальному типу.

Интересны данные, полученные в экспериментах на трансгенных мышах, где было обнаружено, что сверхэкспрессия человеческого α -син дикого типа вызывает нарушение постнатального нейрогенеза в обонятельных луковицах и в ЗФ гиппокампа, которое обусловлено выраженным снижением более чем на 50% выживаемости нейрональных предшественников и незрелых нейронов на стадии дифференцировки, без заметного влияния на процесс пролиферации [3, 7, 23].

Ранее нами было показано, что олигомеры α -син, вводимые интраназально в течение 14-ти дней, активируют процессы пролиферации и дифференцировки в ЗФ гиппокампа стареющих мышей, в то время как фибриллярные структуры α -син в условиях аналогичного экспериментального протокола не оказывают значимого эффекта на пролиферацию и дифференцировку клеток в гиппокампе [17, 18]. Вместе с тем, повышенная экспрессия человеческого α -син либо его мутантных видов инициируют и ускоряют образование *in vitro* нейротоксических амилоидогенных структур α -син [9, 18]. Имеющиеся факты позволяют считать, что в данной работе активация пролиферации клеток в ЗФ гиппокампа при интраназальном введении нативного α -син вызвана действием олигомеров α -син, образовавшихся в ходе накопления белка в мозге. Документированное при этом угнетение выживаемости и дифференцировка нейробластов и незрелых ней-

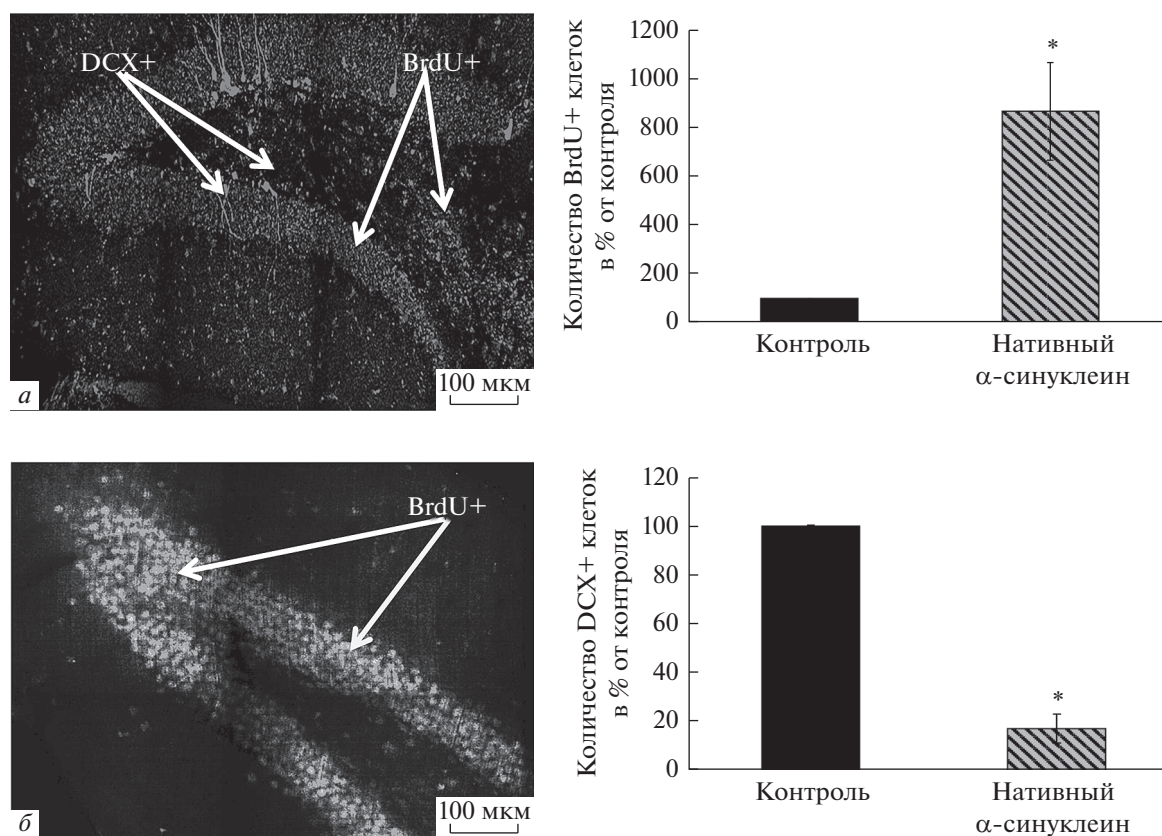


Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление и количество в % от контроля бромдезоксигидин (BrdU+) и даблкортин (DCX+)-позитивных клеток в зубчатой фации гиппокампа у стареющих мышей C57Bl/6, получивших интраназально раствор нативного α -синуклеина. На рисунке слева: иммунохимическая визуализация BrdU+ и DCX+ клеток (отмечено стрелками), а — контроль; б — нативный α -синуклеин; справа: по оси абсцисс — группы животных, по оси ординат — количество BrdU+ и DCX+ клеток на зубчатую фацию в % от контроля.

ронов обусловлено влиянием повышенного содержания нативного α -син.

В поведенческих экспериментах, проведенных в работе, у 60% мышей, получавших нативный α -син, были обнаружены нарушения долговременной ассоциативной памяти, что хорошо сопоставимо с клиническими данными о проявлении нарушений памяти у 30–65% больных с БП на ранних стадиях заболевания [24, 25]. При действии нативного α -син животные также демонстрировали изменения тревожноподобного поведения, проявляющегося отчетливой тенденцией в снижении как числа заходов в открытые рукава ПКЛ (в 2 раза, $p = 0.05$), так и количества посещений углов в ОП (в 1.5 раза, $p = 0.06$) (табл. 2).

Угнетение нейрогенеза в 3Ф гиппокампа и нарушение долговременной пространственной памяти документировано у сверхэкспрессирующих человеческий α -син дикого типа трансгенных мышей. При этом развитие и прогрессирование выявленных нарушений ассоциировано с уровнем экспрессии α -син [3, 9]. Известно, что нарушение постнатального нейрогенеза в гиппокампе вовлечено в развитие когнитивных дисфункций и аф-

ферентных расстройств, характерных для клинических проявлений БП и синуклеопатий [2, 4, 26].

Таким образом, имеющиеся экспериментальные результаты дают основания полагать, что обнаруженные у стареющих мышей при хроническом интраназальном введении нативного α -син нарушения долговременной памяти и изменение тревожноподобного поведения вызваны нарушением процессов нейрогенеза в 3Ф гиппокампа.

В данной работе также обнаружено, что нативный α -син при хроническом интраназальном введении вызывает достоверное снижение скорости двигательной активности и уменьшение на 20% количества ДА-энергических нервных клеток в кЧС мозга стареющих 12-месячных мышей по сравнению с контрольными животными. Полученные экспериментальные факты согласуются с результатами исследований, выполненных на трансгенных мышцах со сверхэкспрессией человеческого α -син его дикого типа. Эти работы показали, что повышенная экспрессия α -син индуцирует прогрессирующее возрастание его содержания в структурах переднего и среднего мозга, которое ассоциировано с развитием двигательных нарушений, а так-

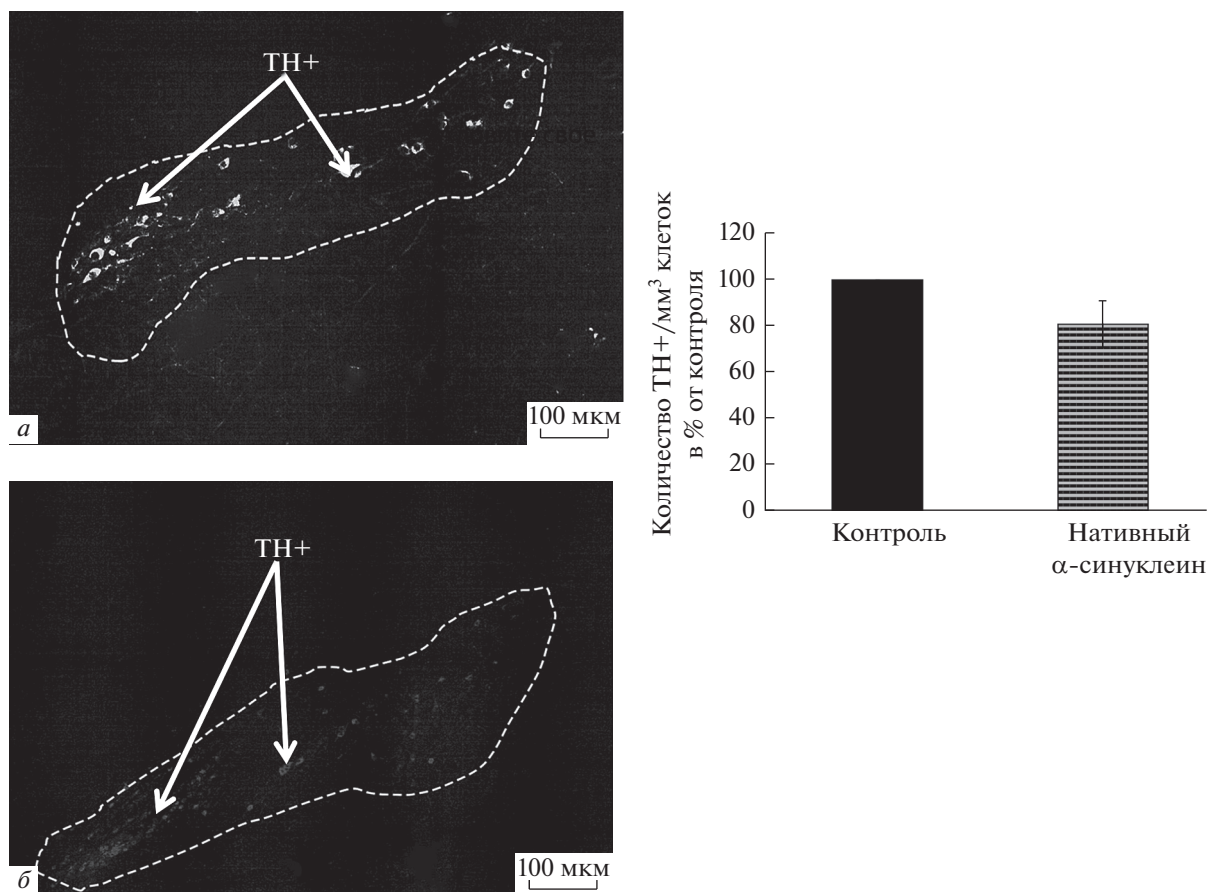


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление и количество в % от контроля тирозингидроксилаза (TH+)-позитивных клеток в *pars compacta* черной субстанции мозга стареющих мышей C57Bl/6, получивших интраназально раствор нативного α -синуклеина. На рисунке слева: иммунохимическая визуализация TH+ клеток, а – контроль; б – нативный α -синуклеин (отмечено стрелками); справа: по оси абсцисс – группы животных, по оси ординат – количество TH+ клеток на мм³ ткани в % от контроля.

же с нейродегенерацией и дефицитом дофамина в nigrostriальной системе [3, 8, 27].

Следует отметить, что двигательные нарушения, выявленные у животных, получавших интраназально нативный α -син, документированы на 17 день эксперимента – спустя 2 дня по окончании 14-дневного интраназального введения белка. Вместе с тем, олигомеры α -син, угнетающие двигательную активность, и фибриллы α -син, вызывающие увеличение скорости движения, инициируют указанные моторные нарушения на 15-й день исследования. Олигомеры α -син вызывают менее выраженное снижение числа DA-ергических нейронов, локализующихся в кЧС мозга, по сравнению с нативным α -син (10–12 и 20% соответственно). Фибриллярные структуры α -син в отличие от нативного α -син и его олигомерных форм увеличивают плотность DA-ергических нервных клеток в кЧС мозга.

Таким образом, различные конформационные структуры белка α -син, изученные нами, в условиях аналогичного экспериментального протокола,

характеризуются существенными особенностями влияния на двигательную активность и содержание DA-ергических нервных клеток в кЧС мозга стареющих мышей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе документировано, что нативный белок α -син, вводимый интраназально в течение 14-ти дней, вызывает у 12-месячных самцов мышей нарушение процессов нейрогенеза в ЗФ гиппокампа и снижение количества DA-ергических нейронов в кЧС мозга. Вместе с тем, у животных выявлено нарушение долговременной ассоциативной памяти, изменение тревожноподобного поведения и снижение скорости двигательной активности. Результаты выполненных нами исследований демонстрируют, что нативный α -син, амилоидогенные олигомеры и фибриллы α -син в условиях аналогичного экспериментального протокола характеризуются избирательным, различающимся выраженностью, направленностью и

временной динамикой действием на нейрогенез в ЗФ гиппокампа, плотность ДА-ергических нейронов в КЧС мозга, а также сопряженные двигательные, когнитивные и аффективные функции стареющих животных.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о значимой роли нарушений нейрогенеза в развитии ряда признаков, характерных для синуклеопатий, и подтверждают концептуальное положение о том, что различные конформации α -син обуславливают формирование определенных видов нейродегенеративных заболеваний, относящихся к синуклеопатиям.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Ludmilla Morozova-Roche, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Sweden за предоставление нативного белка α -синуклеина.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 16-04-00661a.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных в директиве по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/ EU от 22.09.2010 г.), а также в соответствии с правилами, утвержденными комиссией по биоэтике ФГБНУ “Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horgusluoglu E., Nudelman K., Nho K., Saykin A.S. // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr Genet.* 2017. V. 174. № 1. P. 93–112. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32429>
- Winner B., Winkler J. // *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2015. V. 7. № 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021287>
- Nuberg S., Petrasch-Parwez E., Winner B., Winkler J., von Horsten S., Schmidt T., Boy J., Kuhn M., Nguyen H.P., Teismann P., Schulz J.B., Neumann M., Pichler B.J., Reischl G., Holzmann C., Schmitt I., Bornemann A., Kuhn W., Zimmermann F., Servadio A., Riess O. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 10. P. 2471–2484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3040-07.2008>
- Lamm O., Ganz J., Melamed E., Offen D. // *J. Comp. Neurol.* 2014. V. 522. № 12. P. 2817–2839. <https://doi.org/10.1002/cne.203607>
- Regensburger M., Prots I., Winner B. // *Neural Plast.* 2014. V. 2014. P. 454696. <https://doi.org/10.1155/2014/454696>
- La Vitola P., Balducci C., Cerovic M., Santamaria G., Brandi E., Grandi F., Caldinelli L., Colombo L., Grazia Morgese M., Trabace L., Pollegioni L., Albani D., Forloni G. // *Brain Behav. Immun.* 2018. V. 69. P. 591–602. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.012>
- Winner B., Regensburger M., Schreglmann S., Boyer L., Prots I., Rockenstein E., Mante M., Shao C., Winkler J., Masliah E., Gage F.H. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 47. P. 16906–16916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2723-12.2012>
- Rabl R., Breitschaedel C., Flunkert S., Duller S., Amschl D., Neddens J., Neiderkofler V., Rockenstein E., Masliah E., Roemer H., Hutter-Paier B. // *BMC Neurosci.* 2017. V. 18. № 1. P. 22. <https://doi.org/10.1186/s12868-017-0341-8>
- Gomez-Benito M., Granado N., Garcia-Sanz P., Michel A., Dumoulin M., Moratalla R. // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 23. № 11. P. 356. <https://doi.org/10.3389/fphaz.2020.00356>
- Emamzadeh F.N. // *J. Res. Med. Sci.* 2016. V. 9. P. 21–29. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>
- Ghosh D., Mehra S., Sahay S., Singh P.K., Maji S.K. // *J. Biol. Macromol.* 2017. V. 100. P. 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.021>
- Peng C., Gathagan R.J., Lee V.M. // *Neurobiol. Dis.* 2018. V. 109(Pt B). P. 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.07.018>
- Marmolino, D., Foerch, P., Atienzar F.A., Staelens L., Michel A., Scheller D. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2016. V. 71. P. 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.12.012>
- Peelaerts W., Bousset L., Van der Perren A., Moskalyuk A., Pulizzi R., Giugliano M., Van den Haute C., Melki R., Baekelandt V. // *Nature.* 2015. V. 522. № 7556. P. 340–344. <https://doi.org/10.1038/nature14547>
- Gruden M.A., Davidova T.V., Yanamandra K., Kucheryanu V.G., Morozova-Roche L.A., Sherstnev V.V., Sewell R.D. // *Behav. Brain Res.* 2013. № 243. P. 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.011>
- Gruden M.A., Davydova T.V., Narkevich V.B., Fomina V.G., Wang C., Kudrin V.S., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D. // *Behav. Brain Res.* 2014. № 263. P. 158–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.017>
- Sherstnev V.V., Rtdrov A.V., Solovieva O.A., Gruden M.A., Konovalova E.V., Kalinin I.A., Proshim A.T. // *J. Neurochem.* 2017. V. 11. № 4. P. 359–365. <https://doi.org/10.1134/S1819712417040092>
- Sherstnev V.V., Solov'eva O.A., Gruden M.A., Kedrov A.V., Konovalova E.V., Ratmirov A.M. // *J. Neurochem.* 2018. V. 12. № 4. P. 359–365. <https://doi.org/10.1134/S1819712418040062>
- Encinas J.M., Enikolopov G. // *Methods Cell Biol.* 2008. V. 85. P. 243–272. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)85011-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85011-X)
- Franklin K., Paxinos G. // *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd ed. New York, London, Burlington, San Diego: Academic PRESS, 2007.

21. *Braida D., Ponzone L., Matteoli M., Sala M.M.* // *Behav. Brain Res.* 2016. V. 296. P. 393–400.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.016>
22. *Ano Y., Ohya R., Kondo K., Nakayama H.* // *Front. Aging Neurosci.* 2019. V. 4. P. 11–16.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00016>
23. *Winner B., Lie D.C., Rothenstein E., Aigner R., Aigner L., Masliah E., Kuhn H.G., Winkler J.* // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004. V. 63. № 11. P. 1155–1166.
<https://doi.org/10.1093/jnen/63.11.1155>
24. *Pfeiffer H.C., Løkkegaard A., Zoetmulder M., Friberg L., Werdelin L.* // *Acta Neurol. Scand.* 2014. V. 129. № 5. P. 307–318.
<https://doi.org/10.1111/ane.12189>
25. *Rana A.Q., Ahmed U.S., Chaudry Z.M., Vasan S.* // *Expert Rev. Neurother.* 2015. V. 15(5). P. 549–562.
<https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1038244>
26. *Schoenfeld T.J., Gameron H.A.* // *Neuropsychopharmacology.* 2015. V. 40. № 1. P. 113–128.
<https://doi.org/10.1038/npp.2014.230>
27. *Amschl D., Neddens J., Havas D., Flunkert S., Rabl R., Römer H., Rockenstein E., Masliah E., Windisch M., Hutter-Paier B.* // *BMC Neurosci.* 2013. V. 14(16).
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-6>

Neurogenesis in the Hippocampus, Dopaminergic Neurons of the Substantia Nigra, and the Behavior of Aging Mice after Intranasal Administration of Native α -Synuclein Protein

V. V. Sherstnev^a, O. A. Solovieva^a, M. A. Gruden^a, A. M. Ratmirov^a, and E. V. Konovalova^a

^a*Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia*

We studied effects of intranasal administration of the native α -synuclein protein, the overproduction and misfolding of which are considered as a key link in the pathogenesis of Parkinson's disease and other age-related neurodegenerative diseases, on hippocampal neurogenesis, the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the brain, as well as motor activity, learning, memory, and anxiety in aging animals. The experiments were performed with 12-month-old male C57BL/6 mice, which were injected with a solution of recombinant native α -synuclein or physiological saline once a day for 14 days. The following tests were used to assess behavior indices: "Open field", "Novel object recognition", "Passive avoidance", and "Elevated plus maze". Proliferating cells, immature neurons, and dopaminergic nerve cells were detected by immunohistochemistry using antibodies to bromodeoxyuridine, doublecortin, and tyrosine hydroxylase. It was shown that native α -synuclein causes a significant increase in the number of proliferating cells and a decrease in the number of immature neurons in the dentate gyrus of the hippocampus, as well as a decrease in the density of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. In mice that received native α -synuclein, we found a decrease in the speed of motor activity, impaired long-term associative memory, and changes in anxiety behavior. A comparative analysis of the data obtained in this work and the results of our previous studies of the effects of α -synuclein oligomers and fibrils under the conditions of a similar experimental protocol has been performed. The documented facts are considered as experimental evidence of the involvement of impaired postnatal neurogenesis in the development of synucleopathies and support the notion that different conformations of α -synuclein are responsible for the formation of certain types of these neurodegenerative diseases.

Keywords: α -synuclein, neurogenesis, dopaminergic neurons, hippocampus, substantia nigra, behavior, memory, mice, aging, Parkinson's disease

ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ АДДИКТИВНЫХ И АФФЕКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВАХ

© 2021 г. Л. А. Левчук¹, *, О. В. Рощина¹, Г. Г. Симуткин¹, Н. А. Бохан¹, С. А. Иванова¹

¹Научно-исследовательский институт психического здоровья,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

Поступила в редакцию 10.08.2020 г.

После доработки 30.09.2020 г.

Принята к публикации 09.10.2020 г.

Исследования в области патофизиологии психических расстройств свидетельствуют о вовлечении нейробиологических процессов, включая нейровоспалительный ответ, нейрогенез, дегенерацию нейронов, в механизмы развития данных расстройств. Проведено исследование 135 пациентов с аддиктивными и аффективными расстройствами (из них 51 пациент с синдромом зависимости от алкоголя, 41 пациент с текущим депрессивным эпизодом и 43 пациента с коморбидностью синдрома зависимости от алкоголя и аффективного расстройства) и 46 психически здоровых доноров. Содержание нейроспецифических белков (NSE, MBP и GFAP) в сыворотке крови пациентов и здоровых людей определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Исследование периферических маркеров повреждения нервной ткани показало, что для всех пациентов характерны признаки нейронального и глиального дистресса. Результаты дисперсионного анализа и ROC-анализа свидетельствуют о вкладе NSE и MBP в развитие аффективных расстройств, в то время как GFAP обладает большей прогностической эффективностью в случае аддиктивной патологии. Тенденция к нарушению баланса в секреции нейроспецифических белков в сыворотке крови пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективных расстройств усиливается, что, вероятно, свидетельствует о большем дефекте в нейробиологических процессах и нейродегенерации, а также подтверждается данными о более тяжелой клинической симптоматике пациентов в указанных случаях коморбидности.

Ключевые слова: нейрон-специфическая енолаза, основной белок миелина, глиальный фибриллярный кислый белок, синдром зависимости от алкоголя, аффективные расстройства

DOI: 10.31857/S1027813321010076

Исследования в области патофизиологии психических расстройств свидетельствуют о вовлечении нейробиологических процессов, включая нейровоспалительный ответ, нейрогенез, дегенерацию нейронов, в механизмы развития данных расстройств, что диктует необходимость системного подхода к поиску потенциальных биомаркеров [1–4]. Нейропластичность как адаптивная способность нервной ткани реализуется в результате изменений на молекулярном, субклеточном, клеточном и сетевом уровнях пластичности. Астроциты и клетки микроглии обладают компенсаторным механизмом для восстановления поврежденной нейронной сети, реагируя на повреждение нейронов, изменяют экспрессию нейроспецифических белков, имеющих нейропластическое действие [5–7]. Оценка содержания нейроспецифических белков в биологических жидкостях (сыворотке крови и ликворе), выполняющих множество

интегративных функций, отражает степень патологических изменений в нейрональном и глиальном компонентах ткани мозга. Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), основной белок миелина (MBP) и нейрон-специфическая енолаза (NSE) являются маркерами для идентификации отделов мозга, участвующих в нейропсихиатрических расстройствах [8, 9]. GFAP, являясь маркером повреждения, играет важную роль в активации клеток астроглии. Показано, что употребление алкоголя и депрессивные расстройства изменяют морфологию глии и экспрессию GFAP [10]. Нейропсихиатрические расстройства, в том числе аффективные расстройства и шизофрения, и алкоголизм сопровождаются глиальной патологией, нарушением процессов нейропластичности и миелинизации [11–13]. Дисфункция нейропластичности приводит к повышению содержания NSE, биомаркера нейронального повреждения, обладающего нейротрофическим и нейропротекторным действием [6, 14, 15].

* Адресат для корреспонденции: 634014 Россия, Томск, ул. Алеутская, 4; факс: 8(382-2)72-44-25; e-mail: rla2003@list.ru.

Многочисленными авторами показано, что злоупотребление алкоголем приводит к невропатологическому повреждению коры головного мозга, снижению объема белого вещества, уменьшению плотности глиальных клеток в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе, атрофии мозга и потере нейронов [10, 16, 17]. Сверхэкспрессия провоспалительных цитокинов в головном мозге пациентов с аффективной патологией и связанное с этим хроническое нейровоспаление могут привести к нейродегенерации и снижению нейрогенеза, снижению плотности глиальных клеток в лобных областях коры головного мозга [15, 18, 19].

Депрессивные и аддиктивные расстройства характеризуются трансформацией нейроиммунного функционирования, дисфункцией нейропластичности, изменением глиальной или астроцитарной плотности и экспрессии медиаторов воспаления как в ЦНС, так и на периферии [20, 21]. Современные литературные данные показывают нейроиimmunологические изменения, активированные иммунные ответы при синдроме зависимости от алкоголя и аффективном расстройстве, однако существует нехватка знаний о роли нейроиммунной функции в развитии и прогрессировании коморбидного течения алкоголизма и депрессии. Сопряженность этих двух расстройств, негативно влияя на течение и прогноз каждого из них, отличается клиническим полиморфизмом, большей степенью выраженности психопатологических проявлений и обусловлена сложными биологическими механизмами, связанными с дисрегуляцией различных нейроиммунных механизмов [10]. Комплексное исследование периферических маркеров нейродегенерации и нейропластичности позволит установить возможную нейроиммунную этиопатологию как важную часть физиологической связи между алкогольной зависимостью и аффективным расстройством, определить наличие и степень повреждения нервной ткани и оценить компенсаторные возможности ремоделирования нейронных структур головного мозга.

Целью настоящего исследования явилась оценка содержания нейроспецифических белков (NSE, MBP и GFAP) в сыворотке крови пациентов с синдромом зависимости от алкоголя и аффективными расстройствами, а также в случае их коморбидности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено с соблюдением протокола, утвержденного комитетом по биомедицинской этике НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, и принципов информированного согласия Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации.

В исследование включено 135 пациентов с синдромом зависимости от алкоголя и аффективными расстройствами, проходивших лечение в отделениях аддиктивных и аффективных состояний клиник НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Из них 51 пациент с синдромом зависимости от алкоголя (F10.2, МКБ-10), 41 пациент с текущим депрессивным эпизодом в рамках однократного депрессивного эпизода, рекуррентного депрессивного расстройства и биполярного аффективного расстройства (F31, F32, F33, МКБ-10) и 43 пациента с коморбидностью синдрома зависимости от алкоголя и аффективного расстройства. В группу контроля вошли 46 здоровых доноров.

Основными критериями включения для пациентов явились: наличие установленного диагноза аффективного расстройства и/или синдрома зависимости от алкоголя по МКБ-10, возраст 18–60 лет, наличие письменного информированного согласия, принадлежность к европеоидной расе. Критериями исключения — возраст старше 60 лет, наличие алкогольных психозов, органической, неврологической и тяжелой соматической патологии, приводящей к органной недостаточности. Критериями включения для контрольной группы явились: возраст 18–60 лет, наличие письменного информированного согласия. Критериями исключения — возраст старше 60 лет, наличие психических расстройств и соматической патологии в стадии обострения.

Степень тяжести заболевания оценивалась по шкале общего клинического впечатления о тяжести заболевания (Clinical Global Impression scale — Severity (CGI-S) (до начала и на 14-й и 28-й дни терапии).

Материалом для исследования явилась сыворотка крови. У всех обследуемых лиц брали кровь из локтевой вены в период с 8.00 до 9.00 натошак в пробирки фирмы BD Vacutainer с активатором свертывания для получения сыворотки. У пациентов кровь брали до назначения терапии. Содержание маркера повреждения нейронов — нейрон-специфичной енолазы (NSE) — в сыворотке крови пациентов и психически здоровых людей определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов CanAg NSE EIA производства Fujirebio Diagnostics, Inc. (Швеция). Определение концентрации маркера демиелинизации белого вещества — основного белка миелина (MBP) — и маркера повреждения астроглии — глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) — в сыворотке крови исследуемых лиц проводили “Сэндвич”-методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов DY4228-05 Human MBP DuoSet ELISA и DY2594-05 Human GFAP DuoSet ELISA производства “R&D Systems” (США). Постановку реакции проводили согласно прилагаемым к наборам инструкциям.

Таблица 1. Концентрация нейроспецифических белков в сыворотке крови пациентов и психически здоровых лиц (Ме (Q1–Q3))

Показатель	NSE, мкг/л	MBP, пг/мл	GFAP, нг/мл
Пациенты с текущим депрессивным эпизодом	3.91 (3.02–4.86)	43.19 (33.49–46.32)	0.24 (0.1–1.29)
Пациенты с синдромом зависимости от алкоголя	3.62 (2.7–4.33)	33.74 (26.8–40.63)	0.18 (0.08–0.3)
Пациенты с коморбидностью синдрома зависимости от алкоголя и аффективных расстройств	3.67 (2.99–4.55)	43.19 (36.47–45.8)	0.16 (0.08–0.66)
Психически здоровые лица	3.01 (2.52–3.67)	31.65 (29.41–39.16)	0.66 (0.14–1.2)

После проведения и остановки ферментативной реакции проводили количественную оценку результатов анализа на автоматическом микропланшетном спектрофотометре Epoch (BioTek Instruments, США). Конечные результаты выражали в единицах, рекомендованных фирмами-изготовителями для построения калибровочных графиков из стандартных навесок определяемого вещества (мкг/л для NSE, пг/мл для MBP и нг/мл для GFAP).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы SPSS, версия 26.0. Проверку на нормальность распределения значений переменных проводили по критерию Шапиро-Уилка. В связи с тем, что содержание GFAP в сыворотке крови пациентов исследуемых групп не подчинялось закону нормального распределения, для сравнения содержания GFAP в сыворотке крови лиц исследуемых групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующими апостериорными попарными сравнениями с помощью критерия Манна–Уитни с новым критическим уровнем значимости ($p = 0.05/4 = 0.0125$). Сравнение содержания NSE и MBP в сыворотке крови исследуемых лиц проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (“One-way ANOVA”) с последующим попарным апостериорным сравнением групп между собой с использованием поправки Бонферрони. Выявление наиболее эффективных диагностических маркеров в исследуемых группах пациентов проводили с использованием ROC-анализа. Построение ROC-кривой заключается в расположении на осях X и Y частоты истинно положительных результатов (чувствительность) и ложно положительных результатов (100-специфичность) для каждой точки разделения. Для чувствительности и специфичности подсчитывались 95% доверительные интервалы (95% CI). Информативность показателя оценивали по величине площади под кривой (AUC). В соответствии с классификацией J.A. Swets [22], площадь под ROC-кривой от 0.5 до 0.7 свидетельствует о невысокой точности маркера, показатель с площадью под ROC-кривой от 0.7 до 0.9 может быть использован в практике, и площадь под кривой выше 0.9 характеризует маркер, обладающий высокой точностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке тяжести состояния по шкале глобального клинического впечатления о тяжести заболевания (CGI-S) до начала психофармакотерапии статистически значимые различия определены по показателям CGI-S между группами пациентов с синдромом зависимости от алкоголя и пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства, а также между пациентами с текущим депрессивным эпизодом и пациентами с коморбидностью синдрома зависимости от алкоголя и аффективного расстройства ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни): состояние пациентов с двойным диагнозом при поступлении объективно оценивалось врачом как более тяжелое по сравнению с группами с “чистой” нозологией.

Результаты исследования периферических маркеров повреждения нервной ткани у пациентов с текущим депрессивным эпизодом, синдромом зависимости от алкоголя и коморбидностью данных расстройств представлены в табл. 1.

Для сравнения содержания MBP в сыворотке крови пациентов использовали дисперсионный анализ. Уровень статистической значимости критерия Ливиня превышает критическое значение, равное 0.05 ($p = 0.908$), что свидетельствует об отсутствии различий между дисперсиями изучаемого маркера в сравниваемых группах. Результаты дисперсионного анализа ($F_{3,156} = 6.567$; $p = 0.0003$) свидетельствуют о наличии статистических различий между группами. Дальнейшие попарные сравнения с использованием поправки Бонферрони показали статистически значимые различия в содержании MBP в сыворотке крови пациентов с текущим депрессивным эпизодом и синдромом зависимости от алкоголя ($p = 0.013$), пациентов с текущим депрессивным эпизодом и здоровых лиц ($p = 0.003$), пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективного расстройства и здоровых лиц ($p = 0.014$).

Равенство дисперсий NSE в исследуемых группах подтверждается расчетами критерия Ливиня ($p = 0.173$). Результаты дисперсионного анализа ($F_{3,123} = 2.931$; $p = 0.036$) свидетельствуют о наличии различий между группами пациентов и здоровых лиц. Дальнейшие апостериорные срав-

нения выявили статистически значимые различия в содержании NSE в сыворотке крови пациентов с текущим депрессивным эпизодом и психически здоровых лиц ($p = 0.032$).

Сравнение содержания GFAP в сыворотке крови исследуемых пациентов и здоровых лиц показало наличие статистически значимых различий между исследуемыми группами ($p = 0.001$). Попарные сравнения исследуемых групп показали, что содержание GFAP в сыворотке крови пациентов с синдромом зависимости от алкоголя и пациентов с коморбидным сочетанием алкогольной зависимости и аффективных расстройств статистически значимо ниже данного показателя психически здоровых лиц ($p = 0.0001$ и $p = 0.002$ соответственно).

Влияние сывороточных маркеров повреждения нервной ткани на развитие аддиктивных и аффективных расстройств определяли с использованием ROC-анализа. Проведенный ROC-анализ свидетельствует об участии NSE и MBP в развитии текущего депрессивного эпизода (AUC = 0.728; 95% CI 0.596–0.861; $p = 0.001$ и AUC = 0.738; 95% CI 0.607–0.87; $p = 0.0004$ соответственно). GFAP вносит вклад в развитие синдрома зависимости от алкоголя и коморбидности алкогольной зависимости и аффективного расстройства с наибольшим вкладом в развитие “чистой” нозологии (AUC = 0.752; 95% CI 0.647–0.856; $p = 0.000002$ и AUC = 0.696; 95% CI 0.583–0.808; $p = 0.001$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, исследование нейроспецифических белков (NSE, MBP и GFAP) в сыворотке крови пациентов с синдромом зависимости от алкоголя, с текущим депрессивным эпизодом в рамках однократного депрессивного эпизода, рекуррентного депрессивного расстройства и биполярного аффективного расстройства, а также в случае коморбидности алкогольной зависимости с аффективным расстройством и здоровых лиц показало, что для всех исследуемых групп пациентов характерен повышенный уровень NSE (в группе пациентов с текущим депрессивным эпизодом достигнут уровень статистической значимости). Полученные нами результаты согласуются с данными современной литературы. Gules с соавторами [6] и Schmidt с соавторами [14] показано повышенное содержание NSE в плазме крови и спинномозговой жидкости пациентов с депрессивными расстройствами. В исследовании Karabulut с соавторами [15] показана прямая зависимость уровня NSE в плазме крови пациентов с биполярным аффективным расстройством от продолжительности заболевания. Повышение содержания данного белка, согласно литературным данным, связано с повреждениями нейронов вследствие нарушенного метаболизма и структурных изме-

нений в клетках. К нейродегенерации и снижению нейрогенеза приводят сверхэкспрессированные провоспалительные цитокины в мозге и связанное с этим хроническое нейровоспаление, о чем свидетельствует сниженная экспрессия BDNF во множественных областях мозга пациентов с депрессивными расстройствами [23]. Хроническое воздействие этанола сопровождается снижением экспрессии BDNF в гиппокампе людей, а также снижением уровня BDNF в сыворотке и плазме [5, 24]. В нашем предыдущем исследовании на данной выборке пациентов показано, что для пациентов с синдромом зависимости от алкоголя и коморбидным течением алкогольной зависимости и аффективного расстройства характерно сниженное содержание BDNF [25], что свидетельствует, вероятно, о сниженных компенсаторных возможностях ремоделирования нейронных структур головного мозга у данных пациентов. BDNF, важнейший медиатор восстановления и ключевой фактор синаптического ремоделирования, наряду с нейрохимическими маркерами повреждения участвует в молекулярных механизмах нормальной (адаптивной) и aberrантной нейропластичности, нейродегенерации и нейромодуляции.

Нарушение нейропластичности способствует глиальной патологии и демиелинизации, нарушению целостности миелиновых мембран, характеризующих различную нейропатологию, в том числе аффективные расстройства и шизофрению [11–13]. В проведенном нами исследовании показано увеличение содержания MBP в сыворотке крови пациентов с текущим депрессивным эпизодом и пациентов с коморбидностью синдрома зависимости от алкоголя и аффективных расстройств. Tateno с соавторами [26] на клеточной модели показан нейротоксический эффект этанола, сопровождающийся повышенной экспрессией глиальных маркеров, вызывающий, вероятно, атрофические изменения головного мозга и повреждения нервных волокон. Разрушение миелина или олигодендроглиоцитов (демиелинизация), возникающее вследствие повреждения белого вещества головного мозга, сопровождается выходом из пораженной ткани и накоплением MBP в спинномозговой жидкости, а проникая через гематоэнцефалический барьер, MBP индуцирует синтез антител к миелину. Активацию иммунной системы рассматривают как универсальную неспецифическую реакцию на патологический процесс в мозге [27, 28].

В поддержании миелинизации, сохранении гематоэнцефалического барьера, подавлении пролиферации нейронов и расширении нейритов в зрелом мозге определенную роль выполняет GFAP [29]. В многочисленных работах показано снижение экспрессии GFAP в префронтальной коре головного мозга при депрессии и алкоголизме [7, 16]. Несмотря на сходства в глиальных изменениях

при этих заболеваниях, у пациентов с алкоголизмом метаболические изменения вызваны воздействием этанола на длительность астроцитарных процессов, в то время как для депрессии характерны изменения в молекулярных механизмах и снижение плотности глиальных клеток. На культуре клеток показано подавление этанолом пролиферации глиальных клеток и экспрессии GFAP [5]. В исследовании Miguel-Hidalgo с соавторами [10] показана тенденция к снижению уровней GFAP в орбитофронтальной области префронтальной коры пациентов с алкоголизмом, депрессивными расстройствами и их коморбидным течением. Показано, что острое воздействие алкоголя может привести к глиозу и увеличению синтеза GFAP, в то время как длительное употребление этанола приводит к пониженной регуляции иммунореактивности GFAP. В нашей работе показано снижение сывороточного содержания GFAP во всех группах пациентов, что согласуется с литературными данными и свидетельствует, вероятно, о глиальных изменениях в нервных тканях исследуемых пациентов.

ВЫВОДЫ

Таким образом, исследование периферических маркеров повреждения нервной ткани у пациентов с синдромом зависимости от алкоголя и с текущим депрессивным эпизодом в рамках основных аффективных расстройств указывает на признаки нейронального и глиального дистресса у пациентов. Результаты дисперсионного анализа и ROC-анализа свидетельствуют о вкладе NSE и MBP в развитие аффективных расстройств, в то время как GFAP обладает большей прогностической эффективностью в случае аддиктивной патологии. Тенденция к нарушению баланса в секреции нейроспецифических белков в сыворотке крови пациентов с коморбидностью алкогольной зависимости и аффективных расстройств усиливается, что, вероятно, свидетельствует о большем дефекте в нейробиологических процессах и нейродегенерации, а также подтверждается данными о более тяжелой клинической симптоматике пациентов в указанных случаях коморбидности. К снижению нейрогенеза и нейродегенерации может приводить нейровоспаление, нейроиммунологические изменения, активированные иммунные ответы. Различные изменения нейроиммунной функции способствуют развитию аддиктивных и аффективных расстройств. Аллостатические изменения в нейроиммунном функционировании, вероятно, оказывают существенное влияние на развитие, прогрессирование и исход коморбидного течения алкогольной зависимости и аффективных расстройств.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-15-00023 “Клинические особенности и поиск потенциальных биомаркеров коморбидности алкоголизма и аффективных расстройств”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим нормам, утвержденным комитетом по биомедицинской этике НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, и Хельсинкской Декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Информированное согласие. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kennis M., Gerritsen L., van Dalen M., Williams A., Cuijpers P., Bockting C. // *Mol. Psychiatry*. 2020. V. 25. № 2. P. 321–338.
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0585-z>
2. Loonen A.J., Ivanova S.A. // *Front. Hum. Neurosci.* 2016. V. 10. P. 571.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00571>
3. Losenkov I.S., Mulder N.J.V., Levchuk L.A., Vyalova N.M., Loonen A.J.M., Bosker F.J., Simutkin G.G., Boiko A.S., Bokhan N.A., Wilffert B., Hak E., Schmidt A.F., Ivanova S.A. // *Front. Psychiatry*. 2020. V. 11.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00038>
4. Узбеков М.Г., Гурович И.Я., Иванова С.А. // *Социальная и клиническая психиатрия*. 2016. Т. 26. № 1. С. 77–94.
5. Crews F.T., Vetreno R.P. // *Psychopharmacology* (Berlin). 2016. V. 233. P. 1543–1557.
<https://doi.org/10.1007/s00213-015-3906-1>
6. Gules E., Iosifescu D.V., Tural U. // *Neuropsychobiology*. 2020. V. 79. № 3. P. 214–221.
<https://doi.org/10.1159/000505782>
7. Rajkowska G., Stockmeier C.A. // *Curr. Drug Targets*. 2013. V. 14. № 11. P. 1225–1236.
<https://doi.org/10.2174/13894501113149990156>
8. Lamers K.J., Vos P., Verbeek M.M., Rosmalen F., van Geel W.J., van Engelen B.G. // *Brain Res. Bull.* 2003. V. 61. № 3. P. 261–4.
[https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(03\)00089-3](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(03)00089-3)
9. Wunderlich M.T., Lins H., Skalej M., Wallesch C.W., Goertler M. // *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2006. V. 108. № 6. P. 558–63.
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2005.12.006>
10. Miguel-Hidalgo J.J., Waltzer R., Whittom A.A., Austin M.C., Rajkowska G., Stockmeier C.A. // *J. Affect. Disord.* 2010. V. 127. Iss. 1–3. P. 230–240.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2010.06.003>

11. Anbanandam A., Albarado D.C., Tirziu D.C., Simons M., Veeraraghavan S. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 384. № 1. P. 219–227.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.021>
12. English J.A., Pennington K., Dunn M.J., Cotter D.R. // *Biological psychiatry.* 2011. V. 69. № 2. P. 163–172.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.031>
13. Schroeter M.L., Abdul-Khaliq H., Sacher J., Steiner J., Blasig I.E., Mueller K. // *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010. V. 2010. Article ID 780645.
<https://doi.org/10.1155/2010/780645>
14. Schmidt F.M., Mergl R., Stach B., Jahn I., Schönknecht P. // *World J. Biol. Psychiatry.* 2015. V. 16. P. 106–113.
<https://doi.org/10.3109/15622975.2014.952776>
15. Karabulut S., Tasdemir I., Akcan U., Kucukali C.I., Tuzun E., Cakir S. // *Turkish J. Psychiatry.* 2019. V. 30. Iss. 2. P. 1–7. <https://www.doi.org/10.5080/u18376>
16. Lewohl J.M., Wixey J., Harper C.G., Dodd P.R. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005. V. 29. P. 1698–1705.
<https://doi.org/10.1097/01.alc.0000179406.98868.59>
17. Mayfield R.D., Lewohl J.M., Dodd P.R., Herlihy A., Liu J., Harris R.A. // *J. Neurochem.* 2002. V. 81. P. 802–813.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00860.x>
18. Meier T.B., Drevets W.C., Wurfel B.E., Ford B.N., Morris H.M., Victor T.A., Bodurka J., Teague T.K., Dantzer R., Savitz J. // *Brain. Behav. Immun.* 2016. V. 53. P. 39–48.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.003>
19. Zavorotnyy M., Zollner R., Schulte-Gustenberg L.R., Wulff L., Schoning S., Dannowski U., Kugel H., Arolt V., Konrad C. // *J. Neural Transm.* 2018. V. 125. № 2. P. 229–38.
<https://doi.org/10.1007/s00702-017-1811-y>
20. Перегуд Д.И., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. // *Вопросы наркологии.* 2016. № 9–10. С. 29–41.
21. Иванова С.А., Лосенков И.С., Левчук Л.А., Бойко А.С., Вялова Н.М., Симуткин Г.Г., Бохан Н.А. // *Депрессивные расстройства: гипотезы патогенеза и потенциальные биологические маркеры.* Новосибирск, 2018. 199 с.
22. Swets J.A. // *Science.* 1988. V. 240. P. 1285–1293.
23. Lotrich F.E. // *Brain Res.* 2014. V. 1617. P. 113–125.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.06.032>
24. Vetreno R.P., Crews F.T. // In: *Handbook of Clinical Neurology.* Ch. 27 – current hypotheses on the mechanisms of alcoholism / Ed. Edith V.S., Adolf P. Amsterdam: Elsevier. 2014. P. 477–497.
25. Levchuk L.A., Meeder E.M.G., Roschina O.V., Loonen A.J.M., Boiko A.S., Michalitskaya E.V., Epimakhova E.V., Losenkov I.S., Simutkin G.G., Bokhan N.A., Schellekens A.F.A., Ivanova S.A. // *Front. Psychiatry.* 2020. V. 11. P. 296.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00296>
26. Tateno M., Ukai W., Yamamoto M., Hashimoto E., Ikeda H., Saito T. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005. V. 29. № 12. P. 225S–9S.
<https://doi.org/10.1097/01.alc.0000190658.56149.d4>
27. Ключник Т.П., Сарманова З.В., Субботская Н.В., Бархатова А.Н. // *Российский психиатрический журн.* 2015. № 5. С. 85–91.
28. Muller N., Schwarz M. J. // *Curr. Immunol. Rev.* 2010. V. 6. № 3. P. 213–220.
<https://doi.org/10.2174/157339510791823673>
29. Brenner M. // *Neurosci. Lett.* 2014. V. 565. P. 7–13.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.055>

Peripheral Markers of Damage of Nervous Tissue in Addictive and Affective Disorders

L. A. Levchuk^a, O. V. Roshchina^a, G. G. Simutkin^a, N. A. Bokhan^a, and S. A. Ivanova^a

^a*Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*

Studies of the pathophysiology of mental disorders indicate the involvement of neurobiological processes, including neuroinflammatory response, neurogenesis, and neuronal degeneration in mechanisms of development of these disorders. The investigation of 135 patients with addictive and affective disorders (51 patients with alcohol dependence syndrome, 41 patients with a current depressive episode and 43 patients with a comorbid course of alcohol dependence and affective disorder) and 46 healthy control donors were carried out. The content of neurospecific proteins (NSE, MBP and GFAP) in the serum of patients and healthy people was determined by enzyme immunoassay. The study of peripheral markers of nerve tissue damage showed that all patients are characterized by signs of neuronal and glial distress. The results of the study indicate the contribution of NSE and MBP to the development of affective disorders, GFAP has a greater predictive efficiency in the case of addictive pathology. Patients with a comorbid course of alcohol dependence syndrome and depressive disorder are characterized by a strong imbalance in the secretion of neurospecific proteins. This probably indicates a greater defect in neurobiological processes and neurodegeneration, and confirms data on the aggravation of clinical symptoms of both addictive and depressive disorders.

Keywords: neuron-specific enolase, myelin basic protein, glial fibrillary acidic protein, alcohol dependence syndrome, affective disorder

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТИ

© 2021 г. Г. М. Бодиенкова¹, *, Е. В. Боклаженко¹

¹ФГБНУ “Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований”, Ангарск, Россия

Поступила в редакцию 10.06.2020 г.

После доработки 04.07.2020 г.

Принята к публикации 06.07.2020 г.

Цель исследования заключалась в выявлении изменений сыровоточных концентраций цитокинов, белков теплового шока (БТШ 27, БТШ 70), АТ к белкам нервной ткани и оценки их информативной значимости у пациентов с нейросенсорной тугоухостью (НСТ). Под наблюдением находились 38 мужчин, представляющих персонал летного состава (пилоты-инструкторы, командиры воздушного судна, бортмеханики), и 21 — “условно” здоровых мужчин, сопоставимых по возрасту. Установлены отдельные цитокины, вовлеченные в иммунновоспалительный процесс при НСТ. Выявленный дисбаланс цитокинов у обследованных пациентов характеризовался чрезмерной активацией основных воспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α), противовоспалительного IL-4 на фоне снижения IL-2. Нарушение цитокиновой регуляции сопровождалось снижением концентрации одного из белков теплового шока, обладающего иммуномодулирующим действием, — БТШ 70. Показано, что нейроиммунная перестройка проявлялась усилением продукции аутоантител к белкам нервной ткани: S-100 и В-зав. Са-каналу, которые можно рассматривать в качестве маркеров аутоиммунного процесса при НСТ. Совокупность полученных результатов позволила обосновать отдельные наиболее информативные показатели, которые можно рекомендовать в качестве дополнительных критериев в диагностике нейросенсорной тугоухости.

Ключевые слова: нейросенсорная тугоухость, цитокины, белки теплового шока, антитела к нервной ткани, диагностика

DOI: 10.31857/S1027813321010039

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время нейросенсорная тугоухость (НСТ) во всех высокоразвитых странах занимает значительное место среди других форм сенсоневральной патологии. В структуре профессиональных заболеваний потеря слуха, вызванная шумом, составляет от 7 до 12% всех выявляемых случаев тугоухости различного генеза [1]. НСТ развивается в самом трудоспособном возрасте, имеет тенденцию к росту, что определяет медико-социальную значимость проблемы [2]. Для гражданской авиации особенно важна проблема нарушения слуха у лиц летного состава [3]. Изменения в организме, происходящие под влиянием шума, достаточно сложны и до конца не изучены. Нейросенсорная тугоухость относится к проблемным заболеваниям в плане диагностики и лечения. В основе его развития лежит нарушение чувствительных нервных волокон внутреннего уха, слухового нерва и центральных образований слухо-

вой системы. Вместе с тем, в свете современных представлений важную роль в механизмах развития и течения НСТ играет нейроиммунноэндокринная регуляция [4]. Благодаря взаимоотношениям нервной и иммунной систем, патология последних приобретает свои особенности, обусловленные не только прямым воздействием патогенного агента на ту или иную систему, но и опосредованно через изменения другой интегративной системы [5]. Кроме того, течение НСТ довольно часто сочетается с общесоматической патологией, в том числе с сердечно-сосудистой, что создает дополнительные сложности в ее выявлении и диктует необходимость разработки и совершенствования новых патогенетически обоснованных подходов к разработке иммунохимических маркеров и оценке их диагностической значимости.

Цель исследования — выявить изменения сыровоточных концентраций цитокинов, белков теплового шока (БТШ 27 и БТШ 70), АТ к белкам нервной ткани и оценить их информативную значимость у пациентов с профессиональной нейросенсорной тугоухостью.

* Адресат для корреспонденции: 665827, Россия, Иркутская область, г. Ангарск, 12а м-н, д. 3, а/я 1170; тел.: +7(3955)58-69-10 (доб. 1411); e-mail: immun11@ya.ru.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В клинике института проведено обследование 38 мужчин, представляющих персонал летного состава (пилоты-инструкторы, командиры воздушного судна, бортмеханики) с установленным диагнозом нейросенсорной тугоухости (НСТ). Средний возраст обследованных пациентов составил 52.0 ± 1.36 г. Клиническая верификация диагнозов осуществлялась врачами клиники в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Критерием включения в основную группу было наличие установленного во время работы в контакте с вредным производственным фактором диагноза НСТ, отсутствие коморбидной патологии, которая могла бы повлиять на обмен цитокинов (ожирение, сахарный диабет, артериальная гипертензия и т.д.). Все обследования выполнены при поступлении в клинику, до проведения лечения.

Группа сравнения представлена 21 “условно” здоровыми лицами, которые по специфике профессиональной деятельности не подвергались хроническому воздействию шума (средний возраст — 50.35 ± 1.69 лет) и не имели на момент исследования острых и хронических (в стадии обострения) заболеваний. 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). Содержание цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF- α , INF- γ) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем производства “Вектор-Бест” (г. Новосибирск). Концентрацию БТШ 70 и БТШ 27 в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием ELISA kits HSP 70 Assay Design (Enzo LifeScience, США) в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией. С помощью стандартных тест-систем ЭЛИ-Нейро-Тест (МИЦ “Иммункулус” г. Москва) оценивали сывороточные концентрации АТ класса IgG к антигенам нервной ткани: нейрофиламентному протеину-200 (NF-200), глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), S-100, основному белку миелина (ОБМ), вольтажзависимому Са-каналу (В-зав. Са-канал), глутаматным рецепторам (Глу-Р), дофаминовым рецепторам (DA-Р), ГАМК-рецепторам (ГАМК-Р), серотониновым рецепторам (Сер-Р), холинорецепторам (Хол-Р), ДНК, β 2 гликопротеину (Б2ГП).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ “STATISTICA 6.0” (StatSoft, США). Возраст и стаж работы обследованных пациентов представлены в виде средней (М) и ее ошибки (m). Про-

верку нормальности распределения выполняли с использованием критерия Шапиро–Уилкса. Результаты представлены в виде медианы (Ме), нижнего (Q25) и верхнего (Q75) квартилей. Для определения значимости между независимыми выборками при ненормальном распределении использовали критерий Манна–Уитни. 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 пациентов и по заключению местного этического комитета (протокол № 5 от 14.11.12 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активное участие цитокинов во многих жизненно важных процессах организма способствует развитию широкого спектра как функциональных, так и патоморфологических проявлений патологии человека [6]. Результаты оценки изменения сывороточных концентраций цитокинов у пациентов с НСТ (табл. 1) свидетельствуют о нарушении их дисбаланса. Установлено выраженное возрастание концентраций провоспалительных цитокинов: IL-1 β ($p = 0.00002$) и TNF α ($p = 0.002$) относительно лиц группы сравнения. Анализируя изменения противовоспалительного IL-4 у пациентов с НСТ, зарегистрировано также повышение его концентрации ($p = 0.005$). Что касается многофункционального IL-2, то концентрации его статистически значимо ($p = 0.03$) были ниже, чем в группе сравнения. IL-1 β и TNF α относятся к основным воспалительным цитокинам. IL-1 β — секреторные регуляторные белки, обеспечивающие медиаторное взаимодействие в иммунной системе и связи ее с другими системами, а TNF α — цитокины с цитотоксическим и регуляторным действием. Противовоспалительный IL-4 обладает чрезвычайно широким спектром действия. Известно, что к этому лимфокину на различных клетках организма находится рецептор, способный вступать в реакцию с другими цитокинами, благодаря чему проявляются конкурентные отношения про- и противовоспалительных цитокинов. Выявленные изменения цитокинового профиля указывают, что IL-1 β , TNF α , IL-4 и IL-2 могут являться важными факторами иммунопатогенеза при НСТ. Следует отметить, что регуляция защитных реакций организма цитокинами происходит не только в рамках иммунной системы, но и на уровне целостного организма, где цитокины осуществляют связь между иммунной,

Таблица 1. Изменения иммунохимических показателей у пациентов с НСТ, Me(Q₂₅–Q₇₅)

Наименования показателей, единицы измерения	Пациенты с НСТ	Группа сравнения	Показатель статистической значимости, <i>p</i>
БТШ 27, пг/мл	2.75 (0.41–8.17)	1.44 (1.32–1.6)	0.680
БТШ 70, пг/мл	0.05 (0.04–0.12)*	0.12 (0.09–0.13)	0.0003
IL-1β, пг/мл	64.5 (39.6–82.1)*	1.3 (0.55–2.01)	0.00002
IL-2, пг/мл	2.9 (2.08–5.06)*	4.9 (2.88–6.95)	0.030
IL-4, пг/мл	3.7 (0.01–8.6)*	0.01 (0.01–0.32)	0.005
IL-8, пг/мл	11.7 (1.1–43.8)	10.3 (0.01–14.6)	0.755
TNF-α, пг/мл	2.3 (1.2–3.2)*	0.01 (0.01–0.33)	0.002
INF-γ, пг/мл	0.01 (0.01–0.01)	0.01 (0.01–0.28)	0.781
ОБМ, усл. ед.	0.31 (0.26–0.35)	0.31 (0.27–0.36)	0.881
GFAP, усл. ед.	0.35 (0.30–0.42)	0.36 (0.29–0.44)	0.677
S-100, усл. ед.	0.32 (0.26–0.42)*	0.27 (0.23–0.33)	0.042
NF-200, усл. ед.	0.29 (0.25–0.32)	0.31 (0.24–0.32)	0.856
В-зав. Са кан, усл. ед.	0.24 (0.20–0.30)*	0.18 (0.16–0.22)	0.021
Хол-Р, усл. ед.	0.22 (0.19–0.28)	0.20 (0.16–0.23)	0.139
Глу-Р, усл. ед.	0.24 (0.22–0.30)	0.21 (0.17–0.26)	0.067
ГАМК, усл. ед.	0.24 (0.21–0.32)	0.21 (0.16–0.25)	0.052
ДА-Р, усл. ед.	0.23 (0.19–0.30)	0.21 (0.18–0.25)	0.182
Сер-Р, усл. ед.	0.26 (0.24–0.34)	0.24 (0.20–0.26)	0.058
ДНК, усл. ед.	0.17 (0.15–0.17)	0.14 (0.12–0.17)	0.120
В-2 ГП, усл. ед.	0.18 (0.15–0.18)	0.15 (0.11–0.19)	0.004

Примечание: * различия статистически значимы по сравнению группой сравнения при $p < 0.05$.

нервной, эндокринной, кроветворной и другими системами и таким образом служат для их вовлечения в организацию, регуляцию единой защитной реакции [7].

Исследованиями ряда авторов показана важная, при этом недостаточно изученная роль белков теплового шока (БТШ) в функционировании иммунной системы. Установлено, что пул этих белков обладает выраженным иммуномодулирующим действием, в том числе усиливает продукцию цитокинов [8, 9]. Для уточнения патогенетических механизмов развития повреждений на тканевом и клеточном уровнях определен интерес представляла оценка изменений в содержании БТШ 27 и БТШ 70, которым отводится важная роль в выживании клетки при воздействии различных стрессирующих факторов. БТШ 27 – белок конститутивно экспрессируется в физиологических условиях на низком уровне в нетрансформированных клетках. Шаперонная активность его зависит от посттрансляционных модификаций, например фосфорилирования [10]. БТШ 70 участвует в стабилизации структуры белков клетки и ее сохранении. Результаты выполненных исследований свидетельствуют о статистически значимом ($p = 0.003$) снижении концентрации БТШ 70 у пациентов с НСТ до

0.05 (0.04–0.12) пг/мл против 0.12 (0.09–0.13) пг/мл в группе сравнения. При этом содержание БТШ 27 возрастало почти в 2 раза (2.72 (0.41–8.17) пг/мл) у обследованных пациентов при сопоставлении с группой сравнения (1.44 (1.32–1.60) пг/мл), однако не было статистически значимым. Установленное снижение в сыворотке крови БТШ 70 может быть обусловлено накоплением его внутри клетки, обеспечивая защиту внутриклеточных протеидов при воздействии стрессирующих факторов [11]. Считают, что повышенное содержание БТШ 70 в клетке является маркером клеточных и тканевых повреждений [12]. Важно отметить, что различные виды клеточного стресса приводят не только к увеличению внутриклеточного содержания БТШ, но и в ряде случаев индуцируют высвобождение их во внеклеточное пространство [13]. В нашем случае это касается БТШ 27.

Учитывая, что у обследованных нами пациентов течение НСТ сопровождается формированием мозговой дефицитарности, проявляющейся в виде нарушений церебрального энергетического обмена, функционального состояния нейронов соматосенсорной зоны коры головного мозга, таламических структур, когнитивной деятельности [14], на следующем этапе исследований нами

предпринята попытка выявить изменения в продукции антител (АТ) к ряду регуляторных белков нервной ткани. Основанием к тому явились данные литературы, свидетельствующие о том, что в повреждении ткани мозга важную роль играют аутоиммунные реакции. При этом уровни АТ могут служить маркерами развития и выраженности патологического процесса в специализированных структурах нервной ткани [15, 16]. Как следует из данных, представленных в табл. 1, у пациентов с НСТ течение заболевания сопровождалось увеличением сывороточных концентраций АТ к общему белку S-100 ($p = 0.042$) и АТ к В-зав. Са-каналу ($p = 0.021$), которые свидетельствуют об изменениях в задействованных молекулярных компонентах нервной ткани, на которые вырабатываются АТ [17]. Белки S-100 синтезируются глиальными клетками, а затем транспортируются в нейроны и составляют самую большую подгруппу так называемых кальций-связывающих белков, которые выполняют внутриклеточное и экстраклеточное регулирование многих процессов, обеспечивают рост и подвижность клеток, участвуют в регуляции клеточного цикла. Эти белки принимают участие в механизмах транскрипции и дифференциации, в энергетическом метаболизме, а также во многих других жизненно важных процессах, обеспечивающих жизнеспособность клетки [18, 19]. Установлено, что наиболее специфичный для мозга белок S-100B через фосфорилирование других белков участвует в передаче сигнала, обеспечивая тем самым пластические процессы. Аномалии уровней АТ к В-зав. Са-каналу предполагает нарушение водно-электролитного баланса и энергетического метаболизма нейронов, нарушения функции нервно-мышечных контактов и нейрон-нейронных взаимодействий [20]. Длительно сохраняющиеся высокие уровни АТ к указанным выше белкам, по-видимому, играют важную роль в развитии и течении НСТ, принимая участие в регуляции деятельности мозга. Совокупность полученных сведений позволила выделить наиболее информативные показатели (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-2 БТШ 70, АТ к белкам: S-100 и В-зав. Са-каналу) в лабораторной диагностике профессиональной НСТ.

Таким образом, в результате исследований у пациентов с НСТ выявлены отдельные цитокины, вовлеченные в иммуновоспалительный процесс. Дисбаланс цитокинов характеризовался чрезмерной активацией основных воспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α) противовоспалительного IL-4 на фоне снижения IL-2. Нарушение цитокиновой регуляции сопровождалось снижением концентрации одного из белков теплового шока, обладающего иммуномодулирующим действием, — БТШ 70. Низкие концентрации которого в сыворотке крови, по-видимому, обусловлены накоплением его внутри клетки, необходимым для стабилизации

внутриклеточных белков и ее сохранении при воздействии производственных стрессирующих факторов. Показано, что нейроиммунная перестройка проявлялась усилением продукции аутоантител к белкам нервной ткани: S-100 и В-зав. Са-каналу, которые можно рассматривать в качестве маркеров аутоиммунного процесса при НСТ. Совокупность полученных результатов позволила обосновать отдельные, наиболее значимые показатели, которые можно рекомендовать в качестве дополнительных критериев в диагностике нейросенсорной тугоухости.

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. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Информированное согласие. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Преображенская Е.А., Сухова А.В., Ильницкая А.В., Зоркина Л.А. // Медицина труда и промышленная экология. 2017. № 2. С. 38–42.
2. Тарасова Н.В., Корженкова А.В. // Вестник медицинского института РЕАВИЗ. 2011. № 3. С. 20–26.
3. Шешегов П.М., Зинкин В.Н., Сливина Л.П. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2018. Т. 51. № 3. С. 62–68. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2018-52-3-62-68>
4. Лапко И.В., Кирьяков В.А., Павловская Н.А., Ошкардеров О.А., Климкин К.В. // Гигиена и санитария. 2016. Т. 95(11). С. 1061–1065.
5. Полетаев А.Б., Морозов С.Г., Ковалев И.Е. // Регуляторная метасистема (иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза). М.: Медицина, 2002. 168 с.
6. Савченко А.А., Здзиковский Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. // Сибирское медицинское обозрение. 2013. № 1(79). С. 24–28.
7. Симбирцев А.С., Тотолян А.А. // Инфекционные болезни. 2015. № 2. С. 82–98.
8. Зяблицин А.В., Алекперов Э.А., Бойко А.А., Клинова А.В., Троянова Н.И., Сапожников А.М. // Иммунология. 2012. Т. 33. № 1. С. 49–50.
9. Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И. // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20. № 6. С. 859–898.

10. Богатюк М.В., Кайгородова Е.В., Завьялова М.В. // Сибирский онкологический журн. 2014. Приложение 1. С. 23.
11. Bianchi A., Mouli D., Hupont S. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2014. V. 76. P. 14–26.
12. Андреева Л.И. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2002. Т. 1(2). С. 2–18.
13. Sapozhnikov A.M., Ponomarev E.D., Gusarova G.A., Telford G.V. // Cell proliferation. 2002. V. 35. P. 193–206.
14. Шевченко О.И., Лахман О.Л. // Экология человека. 2020. № 2. С. 18–23.
15. Гомазков О.А. // Нейрохимия. 2007. Т. 24. № 2. С. 101–120.
16. Яковлев А.А. // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 2. С. 112–115.
17. Поletaев А.Б. // Молекулярная диспансеризация (новые подходы к раннему проявлению патологических изменений в организме человека: методические рекомендации для врачей). М.: “Иммункулус”, 2014. 80 с.
18. Sedaghat F., Notopoulos A. // HIPPOKRATIA. 2008. V. 12:4. P. 198–204.
19. Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Гранстрем О.К., Карасева О.В., Мещеряков С.В., Реутов В.П., Сушкевич Г.Н., Пинелис В.Г., Рошаль Л.М. // Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова. 2010. № 110(8). С. 30–35.
20. Орлова В.А., Михайлова И.И., Минутко В.П., Симонина А.В. // Социальная и клиническая психиатрия. 2016. Т. 26. № 1. С. 12–19.

Immunochemical Markers of Sensorineural Hearing Loss

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

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

Our aim was to identify changes in serum concentrations of cytokines, heat shock proteins (Hsp 27, Hsp 70), antibodies to nerve tissue proteins and to assess their informative importance in patients with sensorineural hearing loss (SHL). Study involved 38 men under supervision representing flight personnel (instructor pilots, aircraft commanders, flight engineers) and 21 “conditionally” healthy men of comparable in age. Basic cytokines involved in the immunoinflammatory process in SHL have been identified. The detected cytokine imbalance in the patients examined was characterized by excessive activation of major inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α), an anti-inflammatory IL-4, against the background of decreased IL-2. The disorder of cytokine regulation was accompanied by a decrease in the concentration of one of the heat shock proteins with immunomodulatory effect, Hsp 70. Neuroimmune restructuring was shown to be manifested by increased production of autoantibodies to nerve tissue proteins: S-100 and B. Ca-channel, which can be considered as markers of autoimmune process in SHL. The totality of the results obtained allowed to justify the most informative indicators, which may be recommended as additional criteria in diagnosis of sensorineural hearing loss.

Keywords: sensorineural hearing loss, cytokines, heat shock proteins, antibodies to nerve tissue, diagnostics

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ФОЛАТОВ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ В РОССИЙСКОЙ ВЫБОРКЕ

© 2021 г. И. В. Семенов¹, А. С. Пятойкина², Я. С. Загрязская², Г. В. Рукавишников³,
Е. Д. Касьянов³, Т. В. Жилиева^{1, *}, А. С. Благоданова¹, Г. Э. Мазо³

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»
Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

²ГБУЗ НО «Клиническая психиатрическая больница № 1 г. Н. Новгорода», Нижний Новгород, Россия

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 15.06.2020 г.

После доработки 18.08.2020 г.

Принята к публикации 21.08.2020 г.

В ряде зарубежных исследований показано, что при шизофрении чаще, чем в общей популяции, отмечается гипергомоцистеинемия. С одной стороны, она может быть интегральным маркером нарушений обмена фолатов (в результате дефицита витаминов и/или генетической предрасположенности), а с другой стороны — может быть вовлечена в патогенез заболевания посредством нескольких возможных молекулярных механизмов. В России аналогичных исследований не проводилось, кроме того, имеются противоречивые результаты исследований о генетических факторах, вовлеченных в обмен фолатов и гомоцистеина при шизофрении. Цель данного исследования — оценить ассоциацию уровня гомоцистеина, фолатов и кобаламина сыворотки крови с шизофренией в Европейской части России (Нижегородский регион). Для этого случайным образом было отобрано 50 пациентов с шизофренией и 36 здоровых добровольцев, у которых было проведено биохимическое исследование уровней гомоцистеина, фолатов и кобаламина (B12) сыворотки крови. Концентрацию гомоцистеина измеряли на анализаторе Cobas (Roche Diagnostics) с использованием ферментативного анализа. Определение содержания фолатов и витамина B12 проводили методом хемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах (Architect, Abbott lab. S.A.). В результате установлено, что у пациентов уровень гомоцистеина достоверно выше, чем в группе контроля ($p = 0.0041$), а фолатов — достоверно ниже ($p = 0.0072$). Уровень гомоцистеина у пациентов изученной выборки имеет слабую отрицательную статистически значимую корреляцию как с уровнем фолатов ($r = -0.38$; $p = 0.0063$), так и с уровнем B12 ($r = -0.36$; $p = 0.0082$). Гомоцистеин значимо выше у мужчин, чем у женщин, во всей изученной выборке ($Z = -2.1068$, $p = 0.0351$), а также в подгруппах пациентов ($Z = -2.11$; $p = 0.035$) и здоровых ($z = 3.4$; $p = 0.00067$). Полученные данные говорят о необходимости дальнейшего изучения гипергомоцистеинемии и других биохимических маркеров нарушений обмена фолатов при шизофрении в Российской популяции и разработки путей их коррекции для оптимизации терапии этого психического расстройства.

Ключевые слова: шизофрения, гипергомоцистеинемия, кобаламин, фолаты, персонифицированная психиатрия

DOI: 10.31857/S1027813321010118

АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время патогенез шизофрении остается предметом широкого изучения. Одно из наиболее актуальных направлений исследований — поиск и изучение биохимических показателей (биомаркеров), ассоциированных с развитием шизофрении и отдельными ее фенотипическими проявлениями, которые могут быть использованы

не только как диагностические маркеры, но и как мишень для персонифицированной терапии.

С этих позиций интерес представляет гомоцистеин — аминокислота, являющаяся продуктом деметилирования другой аминокислоты метионина, задействованной в большом количестве биологически важных процессов. Гипергомоцистеинемия — интегральный биохимический маркер нарушений одноуглеродного метаболизма — отражает и экзогенные (алиментарный дефицит фолатов и/или кобаламина), и эндогенные (генетические) их причины при шизофрении: в обширных мета-ана-

* Адресат для корреспонденции: 603005 Россия, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1; e-mail: bi-zet@inbox.ru.

лизах показана ассоциация с шизофренией дефицита фолатов плазмы ($N = 3700$) [1], а также генетических маркеров нарушений обмена фолатов ($N = 23441$) [2].

В 1994 г. Regland et al. описали случай шизофрении у 27-летней женщины, ассоциированный с низкой активностью фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) и повышением уровня гомоцистеина плазмы [3]. Затем Regland et al. (1995) сообщили, что 45% пациентов с шизофренией, которых они обследовали, имеют гипергомоцистеинемию, не связанную с психотропной терапией или дефицитом в питании фолатов и кобаламина [4], что свидетельствовало о вкладе генетических факторов.

В дальнейшем в многочисленных исследованиях в разных странах было показано, что среди больных шизофренией гипергомоцистеинемия встречается чаще, чем в общей популяции [5–7]. Согласно мета-анализу Muntjewerff et al. (2006) превышение уровня гомоцистеина плазмы на 5 мкмоль/л повышает вероятность шизофрении на 70% [8]. Petronijević et al. (2008) показали, что у пациентов при поступлении в стационар при экзacerbации шизофрении уровень гомоцистеина значительно выше, чем в группе контроля, а уровень фолатов и кобаламина от контроля не отличается. Причем уровень гомоцистеина коррелировал с выраженностью негативной симптоматики. У всех пациентов через месяц лечения в период стабилизации состояния уровень гомоцистеина заметно снизился (2.68 ± 1.57 мкмоль/л), но корреляция с выраженностью негативной симптоматики по-прежнему сохранялась (пациенты не получали витамины дополнительно к терапии) [9]. Согласно Mabrouk et al. (2011), среди пациентов с шизофренией уровень гомоцистеина выше, чем в контроле независимо от формы заболевания, возраста и пола больных [10]. Поэтому, согласно авторам, гомоцистеин может иметь отношение к патофизиологическим аспектам шизофрении. К настоящему времени получены обширные мета-анализы, согласно которым гипергомоцистеинемия имеет каузальную связь с шизофренией ($N = 25599$) [11].

По данным Kim, Moon (2011), среди женщин с шизофренией гипергомоцистеинемия отмечалась в 33.8% случаев, среди мужчин — в 51.5% [12]. Похожие данные получили Levine et al. (2005): в популяции больных шизофренией и биполярным расстройством уровень гомоцистеина оказался значительно выше, чем среди здорового контроля, и практически полностью за счет молодых пациентов-мужчин [13].

Интересно, что данные о генетических маркерах нарушений обмена фолатов при шизофрении в России остаются противоречивыми [14, 15], возможно в связи с географическими, этническими и методологическими различиями проведен-

ных до настоящего времени исследований, что говорит об актуальности продолжения изучения этой темы в России, необходимости проведения дополнительных исследований и мета-анализов.

Избыток гомоцистеина участвует в процессах оксидативного стресса, оказывает негативное воздействие на глутаматергическую систему, влияет на эндотелий кровеносных сосудов [16, 17]. Важным аспектом изучения данной темы является то, что гипергомоцистеинемия ассоциирована с широким спектром соматических заболеваний (сердечно-сосудистых, метаболических) [18–20], что может вносить вклад в высокую коморбидность шизофрении с этим кругом расстройств, влиять на формирование метаболических осложнений лечения и продолжительность жизни пациентов. При гипергомоцистеинемии повреждения, схожие с атеросклеротическими, могут проявляться даже в молодом возрасте и при отсутствии высокого уровня ЛПНП (липопротеинов низкой плотности) [20].

Публикаций об ассоциации гипергомоцистеинемии с шизофренией в Российской популяции не встречается. Согласно данным литературы, в России дефицит фолатов — один из наиболее распространенных гиповитаминозов (более 50% населения) [21], который может приводить к гипергомоцистеинемии, особенно при наличии полиморфных аллелей в генах ферментов фолатного цикла, что требует специального изучения.

Особенно актуально изучение гипергомоцистеинемии в связи с тем, что она поддается коррекции, поэтому ее гипотетическое патогенетическое воздействие на ЦНС и другие системы организма может компенсироваться, что может благоприятно отразиться на течении заболевания.

Цель данного исследования — оценить ассоциацию уровня гомоцистеина, фолатов и кобаламина сыворотки крови с шизофренией в Европейской части России (Нижегородский регион).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методом сплошной выборки было обследовано 50 пациентов и 36 здоровых добровольцев. Критериями включения пациентов в исследование были: подтверждение диагноза шизофрении с помощью структурированного клинического диагностического “Международного нейропсихиатрического интервью” Диагностического и статистического руководства 5-й версии (Mini International Neuropsychiatric Interview, MINI для DSM-5); способность пациента дать осознанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании; отсутствие хронических соматических заболеваний и неврологических расстройств, ассоциированных с воспалением, оксидативным стрессом, гипергомоцистеинемией,

Таблица 1. Демографическая характеристика изученных выборок

Показатель	Пациенты, $n = 50$	Здоровые, $n = 36$	P
Женщины : мужчины, абс.	24 : 26	21 : 15	$\chi^2 = 0.53; p = 0.47$
Возраст, Ме [Q1; Q3]/[Min; Max] лет	29 [22; 33]/[18; 54]	25 [22; 32]/[19; 58]	$Z = -0.48; p = 0.63$

Примечание: уровень значимости различий оценивался с помощью таблиц сопряженности (критерий χ^2 с поправкой Йетса) и критерия Манна–Уитни (Z), распределение выборки по возрасту отличалось от нормального (тест Шапиро–Уилка: $W = 0.90; p = 0.0001$); Ме [Q1; Q3] – медиана, межквартильный размах, Min – минимальное значение, Max – максимальное значение.

нарушениями обмена фолатов, фенилаланина; отсутствие приема витаминов, противовоспалительных средств, антиоксидантов в течение месяца до включения в исследование. Критериями включения здоровых добровольцев в исследование являлись: отсутствие зарегистрированных ранее на протяжении жизни психических расстройств (здоровый доброволец не наблюдается у психиатра и ранее не обращался к психиатрам по поводу проблем с психическим здоровьем), социальной дезадаптации, злоупотребления психоактивными веществами; соответствие по полу и возрасту пациентам, включенным в исследование; отсутствие хронических соматических заболеваний и неврологических расстройств, ассоциированных с воспалением, оксидативным стрессом, гипергомоцистеинемией, нарушениями обмена фолатов, фенилаланина; отсутствие приема витаминов, противовоспалительных средств, антиоксидантов в течение месяца до включения в исследование.

Как видно из табл. 1, по социодемографическим показателям выборки пациентов и здоровых добровольцев сопоставимы. Все участники исследования – постоянные жители Нижегородской области. Обследование пациентов осуществлялось в период с апреля 2019 г. по февраль 2020 г., здоровых добровольцев – с сентября 2019 по февраль 2020 г.

Средняя длительность заболевания с момента манифестации у пациентов составила 21.5 ± 2.8 мес. ($M \pm SE$), все они получали антипсихотическую терапию: 12 человек в отделениях дневного пребывания, 36 стационарно и 2 в амбулаторных условиях. 17 пациентов получали антипсихотики 1-го поколения, 33 – 2-го поколения. У одной пациентки была комбинированная терапия 2 антипсихотиками 2-го поколения (арипипразол + кветиапин), остальные получали монотерапию. Пациенты изученной выборки не получали антиконвульсанты, метотрексат и другие антагонисты фолатов.

Забор венозной крови осуществлялся строго натощак в утренние часы из локтевой вены, материалом для биохимических исследований служила сыворотка. Концентрация гомоцистеина измерялась на анализаторе Cobas (Roche Diagnostics) с использованием ферментативного анализа. Была исследована сыворотка крови 50 пациентов с ди-

агнозом шизофрении и 36 здоровых добровольцев. Определение содержания фолатов (фолиевой кислоты) и кобаламина (далее B12) проводили методом хемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах (Architect, Abbott lab. S.A.). Концентрацию гомоцистеина измеряли на анализаторе Cobas (Roche Diagnostics). Использовался ферментативный анализ. Лабораторные исследования выполнены на базе Централизованной лаборатории “АВК-Мед”.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы Statistica 6.0. Проверка нормальности распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Распределение полученных данных отличалось от нормального, поэтому при сравнении групп использовался непараметрический критерий Манна–Уитни; при анализе таблиц сопряженности – критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность, для оценки корреляции между биохимическими параметрами использовался критерий ранговой корреляции Спирмена (ρ). Данные представлены с использованием показателей среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение ($m \pm \sigma$), медиана и межквартильный размах (Ме [Q1; Q3]). Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределения полученных данных биохимических исследований образцов пациентов и контрольной группы отличались от нормального (критерий Шапиро–Уилка для уровней гомоцистеина $W = 0.65, p < 0.0001$; фолатов $W = 0.88, p < 0.0001$; B12 $W = 0.89, p < 0.0001$); в связи с этим для дальнейшего анализа этих данных применялись непараметрические критерии.

Как видно из табл. 2, уровень фолатов у пациентов статистически значимо ниже, а уровень гомоцистеина – статистически значимо выше, чем у здоровых. Среди пациентов с гипергомоцистеинемией (выше 10 мкмоль/л, $n = 42$) у 11 (26%) фолаты были ниже референсных значений, у 31 – в пределах нормы.

Уровень гомоцистеина у пациентов изученной выборки имеет слабую отрицательную статисти-

Таблица 2. Результаты биохимических исследований в группах пациентов и здорового контроля

Показатель (в сыворотке)	Пациенты, <i>n</i> = 50	Здоровые, <i>n</i> = 36	Критерий Манна–Уитни; P/Benjamini- Hohberg Adjusted P
Гомоцистеин, мкмоль/л: <i>m</i> ± <i>σ</i> ; Me [Q1; Q3]	15.58 ± 8.52; 13.65 [11.06; 17.47]	12.01 ± 4.33; 11.21 [9.29; 12.96]	<i>z</i> = −2.99; <i>p</i> = 0.0027/ <i>p</i> = 0.0041
Фолаты, нг/мл: <i>m</i> ± <i>σ</i> ; Me [Q1; Q3]	3.79 ± 2.17; 3.30 [2.40; 4.30]	4.66 ± 1.76; 4.40 [3.50; 5.40]	<i>z</i> = 3.03; <i>p</i> = 0.0024/ <i>p</i> = 0.0072
B12, пг/мл: <i>m</i> ± <i>σ</i> ; Me [Q1; Q3]	333.48 ± 159.07; 281.00 [220.00; 440.00]	291.78 ± 89.98; 263.50 [227.00; 359.50]	<i>z</i> = −0.63; <i>p</i> = 0.53/ <i>p</i> = 0.53

Примечание: уровень значимости различий оценивался с помощью критерия Манна–Уитни (*Z*); Me [Q1; Q3] – медиана и межквартильный размах; “*m* ± *σ*” – среднее ± стандартное отклонение.

Таблица 3. Результаты биохимических исследований у мужчин и женщин в подгруппах пациентов и здорового контроля

Показатель (сыворотка)	Пациенты, <i>n</i> = 50		<i>Z</i> ; <i>P</i>	Здоровые, <i>n</i> = 36		<i>Z</i> ; <i>P</i>
	М (<i>n</i> = 26)	Ж (<i>n</i> = 24)		М (<i>n</i> = 15)	Ж (<i>n</i> = 21)	
Гомоцистеин, мкмоль/л: Me [Q1; Q3]	14.4 [12.8; 18.1]	12.1 [9.5; 17.0]	<i>Z</i> = −2.11; <i>p</i> = 0.035	13.6 [11.3; 16.2]	9.9 [9.0; 11.8]	<i>z</i> = 3.4; <i>p</i> = 0.00067
Фолаты, нг/мл: Me [Q1; Q3]	3.3 [2.6; 4.3]	3.1 [2.2; 4.3]	<i>Z</i> = −0.53; <i>p</i> = 0.59	3.9 [3.4; 5.1]	4.6 [3.8; 6.5]	<i>z</i> = −1.6; <i>p</i> = 0.11
B12, пг/мл: Me [Q1; Q3]	276 [193; 382]	292.5 [237; 451]	<i>Z</i> = 0.94; <i>p</i> = 0.35	247.5 [213.5; 279.5]	302 [241; 372]	<i>z</i> = −1.9; <i>p</i> = 0.055

Примечание: уровень значимости различий оценивался с помощью критерия Манна–Уитни (*Z*); Me [Q1; Q3] – медиана и межквартильный размах; М – мужчины, Ж – женщины.

чески значимую корреляцию как с уровнем фолатов ($\rho = -0.38$; $p = 0.0063$), так и с уровнем B12 ($\rho = -0.36$; $p = 0.0082$). У здоровых добровольцев отмечается слабая отрицательная статистически значимая корреляция с уровнем B12 ($\rho = -0.39$; $p = 0.016$), при этом очень слабая отрицательная и статистически не значимая – с уровнем фолатов ($\rho = -0.27$; $p = 0.10$).

Гомоцистеин значимо выше у мужчин, чем у женщин во всей изученной выборке ($Z = -2.1068$, $p = 0.0351$), как видно из табл. 3, и у пациентов, и у здоровых добровольцев, причем у здоровых различия более выраженные несмотря на малый объем выборки. Кроме того, различия по уровню B12 в выборке здоровых между мужчинами и женщинами приближаются к границе статистической значимости. При проведении дополнительного анализа выявлено, что статистически значимые различия между пациентами и здоровыми по

уровню фолатов и гомоцистеина выявлены только внутри подгруппы женщин ($Z = -2.6742$, $p = 0.0074$ и $Z = -2.0590$, $p = 0.0395$ соответственно), но не мужчин.

Согласно оценке значения коэффициента корреляции, у пациентов ассоциация длительности заболевания с уровнем фолатов ($\rho = -0.045$; $p = 0.76$), гомоцистеина ($\rho = 0.18$; $p = 0.22$) и B12 ($\rho = -0.061$; $p = 0.67$) практически отсутствует.

Отмечается слабая статистически значимая обратная корреляция уровня фолатов с возрастом пациентов ($\rho = -0.32$; $p = 0.024$), при этом связь уровня гомоцистеина ($\rho = 0.056$; $p = 0.70$) и B12 ($\rho = -0.021$; $p = 0.88$) у пациентов с возрастом практически отсутствует. У здоровых добровольцев связь всех изученных биохимических показателей с возрастом практически отсутствует (для

фолатов $p = 0.028$; $p = 0.87$; для гомоцистеина $p = 0.11$; $p = 0.51$; для B12 $p = -0.093$; $p = 0.58$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании получены результаты о повышенном уровне гомоцистеина в сыворотке крови у пациентов с шизофренией, что согласуется с данными аналогичных зарубежных исследований [4–13] и может свидетельствовать о роли гипергомоцистеинемии в патогенезе шизофрении и в российской популяции пациентов. Наличие статистически значимых отрицательных корреляций уровня гомоцистеина у пациентов с уровнями фолатов и B12 отражает известные представления о том, что гомоцистеин является интегральным биохимическим маркером нарушений одноуглеродного метаболизма независимо от их причины.

В подавляющей части случаев у пациентов наблюдается низкий уровень фолатов (в нижнем квартиле разброса данных) и одновременно гипергомоцистеинемия, и у 11 из 42 (26%) пациентов с гипергомоцистеинемией уровень фолатов был ниже референсных значений. При этом у пациентов с уровнем фолатов ниже референсных значений средний уровень гомоцистеина 21.38 ± 4.24 мкмоль/л ($M \pm SE$, здесь и далее — среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего), у пациентов с нормальным уровнем фолатов — 13.74 ± 0.68 мкмоль/л ($M \pm SE$). Это говорит о том, что в достаточно большой доле случаев гипергомоцистеинемия у пациентов с шизофренией в российской популяции обусловлена либо экзогенным дефицитом фолатов (например, связанным с их дефицитом в пище), либо нарушениями всасывания фолатов из пищи в кишечнике (известны генетические факторы, предрасполагающие к нарушениям утилизации фолатов из кишечника).

У ряда пациентов с гипергомоцистеинемией фолаты сыворотки были не только в пределах нормы, но в средних и даже высшем квартиле распределения данных в выборке. При этом среди пациентов с гипергомоцистеинемией и нормальным уровнем фолатов средний уровень B12 также выше (335.5 ± 26.6 пг/мл, $M \pm SE$), чем среди пациентов с низким уровнем фолатов (средний уровень B12 — 261.3 ± 43.0 пг/мл, $M \pm SE$). Таким образом, можно говорить об аддитивном эффекте дефицита этих двух витаминов у одних и тех же пациентов. Кроме того, это соответствует полученным ранее сведениям о высокой распространенности среди пациентов с шизофренией низкофункциональных аллелей SNP ключевых ферментов фолатного цикла, способствующих развитию гипергомоцистеинемии даже при достаточном поступлении с пищей и нормальных концентрациях в сыворотке

фолатов и B12 [15, 22]. Можно предположить носительство этих низкофункциональных аллелей у пациентов изученной выборки с гипергомоцистеинемией и нормальной концентрацией витаминов в сыворотке, что требует дальнейшего изучения.

Учитывая имеющиеся в литературе данные о том, что гомоцистеин может участвовать в патогенезе шизофрении посредством нескольких (альтернативных или дополняющих друг друга) механизмов [23], требуются дальнейшие исследования об ассоциации гипергомоцистеинемии при шизофрении с показателями окислительного стресса, эндотелиальной дисфункции, нейровоспаления. До сих пор клинически не подтверждено, является ли гипергомоцистеинемия при шизофрении патогенетическим механизмом или является лишь артефактом, отражающим дефицит фолатов и ассоциированные с ним дефициты тетрагидриобиптерина и метионина (которые, в частности, могут приводить к дефициту синтеза дофамина и другим нейрохимическим нарушениям) [3, 23].

Одним из важных аспектов нарушений фолатного обмена при шизофрении является то, что воспалительные и окислительные процессы, ассоциированные с гипергомоцистеинемией, могут быть вовлечены в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний, которые при шизофрении встречаются достоверно чаще, чем в общей популяции, и являются одной из ведущих причин снижения продолжительности жизни при шизофрении [24, 25]. Так, гомоцистеин способен вызывать изменения сосудистой стенки, взаимодействуя с особым типом белков соединительной ткани, что в конечном итоге приводит к кальцификации сосудистой интимы [26]. Гомоцистеин также способен взаимодействовать с белками экстрацеллюлярного матрикса, что может способствовать формированию системного органного поражения [27]. Глутаматергическая активность гомоцистеина и его дериватов, опосредованная NMDA-рецепторами, может быть вовлечена как в развитие эксайтотоксичности и нейродегенеративных нарушений при шизофрении, так и обуславливать нарушения свертываемости, воспаление сосудистой интимы и тромбообразование при воздействии на периферические NMDA-рецепторы клеток крови и иммунной системы [28].

Данные, полученные в одном регионе, не могут экстраполироваться на всю территорию России, так как известно, что распределение частот генетических полиморфизмов ключевых ферментов фолатного цикла значительно различается в разных выборках [29], кроме того нет согласованности в данных об ассоциации полиморфизма MTHFR677C>T с шизофренией в разных российских исследованиях [14, 15]. Учитывая, что

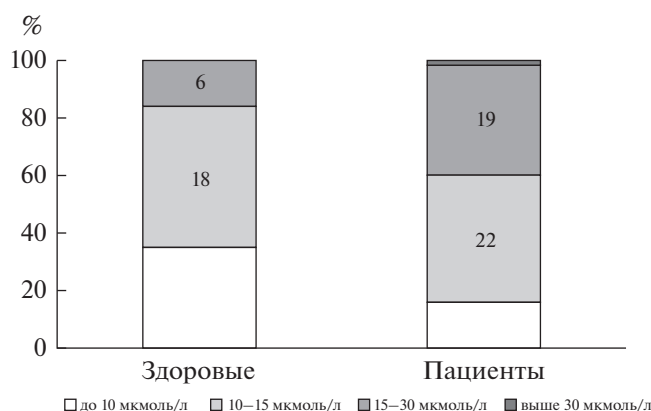


Рис. 1. Распределение субъектов с различным уровнем гомоцистеина в обследованных выборках.

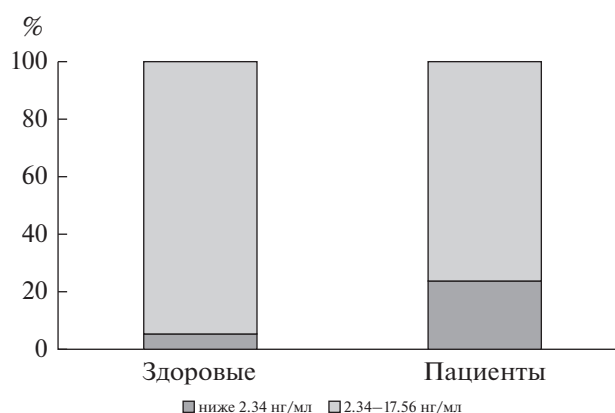


Рис. 2. Распределение субъектов с различным уровнем фолатов в обследованных выборках.

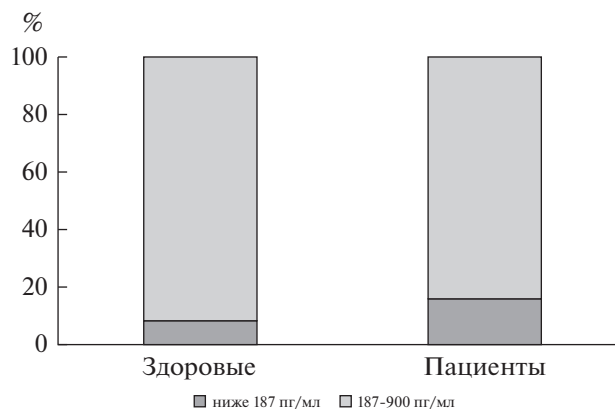


Рис. 3. Распределение субъектов с различным уровнем В12 в обследованных выборках.

уровень гомоцистеина у пациентов нижегородского региона является высоким (межквартильный размах полностью находится выше рекомендованного ВОЗ уровня в 10 мкмоль/л, не представляющего угроз для здоровья), дальнейшее изучение данной темы (как биохимических показателей фолатного обмена, так и генетических

маркеров) представляется актуальным для других регионов России.

Заслуживает также внимания факт, что у здоровых добровольцев, несмотря на статистически значимо меньший уровень гомоцистеина, чем у пациентов, далеко не у всех он находится в пределах нормы (рис. 1–3). Особенно это насторажива-

ет в связи с тем, что были обследованы люди молодого возраста (табл. 1). Так как с возрастом уровень гомоцистеина нарастает (согласно данным литературы), это заставляет предполагать, что средний уровень гомоцистеина в общей популяции средней полосы России еще более высокий, что сопряжено с высоким риском для популяционного здоровья. Учитывая мультисистемное патологическое действие этого патогенетического фактора и его роль в развитии сердечно-сосудистых, акушерских, неврологических расстройств, необходимы масштабные исследования нарушений обмена фолатов и уровня гомоцистеина в общей российской популяции, в частности, для постановки вопроса о фортификации пищи витаминами (по примеру целого ряда стран) или разработки других профилактических стратегий [30].

Имеющиеся различия в уровне гомоцистеина у мужчин и женщин отражают данные литературы [11, 12]. Учитывая то, что более высокий уровень гомоцистеина у мужчин и среди пациентов, и среди здоровых не сопровождается значимыми различиями между мужчинами и женщинами по уровню фолатов и В12, а также то, что полученные ранее данные для того же региона не выявили разницы между мужчинами и женщинами в распространенности генетических факторов, влияющих на уровень гомоцистеина — SNP ключевых ферментов фолатного цикла [15, 22], требуются дополнительные исследования механизмов развития гипергомоцистеинемии у мужчин (или протективных механизмов в отношении гипергомоцистеинемии у женщин).

То, что статистически значимые различия между пациентами и здоровыми по уровню фолатов и гомоцистеина выявлены только внутри подгруппы женщин, но не мужчин, позволяет предположить то, что основной вклад в ассоциацию нарушений обмена фолатов с шизофренией вносит именно женская популяция. Но с другой стороны, в подгруппе мужчин тенденция к более высокому уровню гомоцистеина и меньшему уровню фолатов также прослеживается, поэтому, учитывая малый объем выборки (особенно здоровых мужчин), а также более высокий уровень гомоцистеина у мужчин (и среди пациентов, и среди здоровых), дальнейшее изучение нарушений обмена фолатов при шизофрении в российской популяции представляется актуальным как среди женщин, так и среди мужчин.

В проведенном исследовании не оценивались генетические маркеры, влияющие на одноуглеродный обмен, что планируется сделать в дальнейшем. Кроме того, с клинической точки зрения в дальнейших исследованиях важно оценить, какие кластеры симптомов в большей степени ассоциированы

с гипергомоцистеинемией. Это имеет практическое значение, так как открывает возможности для персонифицированной диагностики и коррекции уровня гомоцистеина и патогенетической коррекции отдельных симптомов шизофрении.

Персонифицированная психиатрия может дать новые недорогие способы патогенетической коррекции симптомов шизофрении, однако это требует дальнейшего тщательного изучения с анализом отдельных клинических случаев, проспективным дизайном, включением в комплекс биомаркеров для оценки путей коррекции не только биохимических, но и генетических маркеров, влияющих на одноуглеродный обмен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в изучаемой выборке пациентов с шизофренией (Нижегородский регион) уровень гомоцистеина статистически значимо выше, чем в выборке здоровых добровольцев, сопоставимой по полу и возрасту, что частично может объясняться статистически значимо меньшим уровнем фолатов и меньшим уровнем В12 в выборке пациентов и говорит о необходимости дальнейшего изучения нарушений обмена фолатов (гипергомоцистеинемии) при шизофрении в российской популяции, а также разработки путей персонифицированной коррекции уровня гомоцистеина у пациентов с шизофренией. Высокая частота выявления биохимических маркеров нарушений обмена фолатов в выборке здоровых добровольцев говорит об актуальности изучения этой темы не только с точки зрения этиопатогенеза шизофрении, но и с позиции популяционного здоровья в России.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 19-015-00420А.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Исследование проводилось с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, протокол и информированное согласие для участников одобрены Этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета (13.03.2019 г.).

Информированное согласие. Все участники исследования дали письменное информированное согласие на участие и обработку данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang D., Zhai J.-X., Liu D.-W. // *Psychiatry Res.* 2016. V. 235. P. 83–89.
2. Yadav U., Kumar P., Gupta S., Rai V. // *Asian J. Psychiatry*. 2016. V. 20. P. 41–51.
3. Regland B., Johansson B.V., Gottfries C.G. // *J. Neural Transm.: Gen. Sect.* 1994. V. 98. № 2. P. 143–152.
4. Regland B., Johansson B.V., Grenfeldt B., Hjelmgren L.T., Medhus M. // *J. Neural Transm.: Gen. Sect.* 1995. V. 100. № 2. P. 165–169.
5. Applebaum J., Shimon H., Sela B.A., Belmaker R.H., Levine J. // *J. Psychiatr. Res.* 2004. V. 38. № 4. P. 413–416.
6. Levine J., Stahl Z., Sela B.A., Ruderman V., Shumaico O., Babushkin I., Osher Y., Bersudsky Y., Belmaker R.H. // *Biol. Psychiatry*. 2006. V. 60. № 3. P. 265–269.
7. Haidemenos A., Kontis D., Gazi A., Kallai E., Allin M., Lucia B. // *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2007. V. 31. № 6. P. 1289–1296.
8. Muntjewerff J.W., Kahn R.S., Blom H.J., den Heijer M. // *Mol. Psychiatry*. 2006. V. 11. № 2. P. 143–149.
9. Petronijević N.D., Radonjić N.V., Ivković M.D., Marinković D., Piperski, V.D., Duricić B.M., Paunović, V.R. // *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2008. V. 32. № 8. P. 1921–1926.
10. Mabrouk H., Douki W., Mechri A., Younes M.K., Omez-zine A., Bouslama A., Gaha L., Najjar M.F. // *L'Encéphale*. 2011. V. 37. № 4. P. 308–313.
11. Numata S., Kinoshita M., Tajima A., Nishi A., Imoto I., Ohmori T. // *BMC Med. Genet.* 2015. V. 16. P. 54.
12. Kim T.H., Moon S.W. // *Psychiatry Invest.* 2011. V. 8. № 2. P. 134–140.
13. Levine J., Sela B.A., Osher Y., Belmaker R.H. // *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2005. V. 29. № 7. P. 1181–1191.
14. Коровайцева Г.И., Габаева М.В., Голимбет В.Е. // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020. Т. 120. № 3. P. 48–52.
15. Zhilyaeva T.V., Sergeeva A.V., Blagonravova A.S., Kasimova L.N., Kuznetsov K.V., Golovanova V.I., She-bolkova T.B., Korshunova E.A. // *Asian J. Psychiatry*. 2018. V. 32. P. 29–33.
16. Boldyrev A.A. // *Biochemistry (Moscow)*. 2009. V. 74. № 6. P. 589–598.
17. Pratt C.W., Cornely K. // *Essential Biochemistry* / Wiley. 2018. P. 472.
18. Ельчанинов А.П., Капустин С.И., Сироткина О.В. // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2002. № 5. С. 37–42.
19. Ford E.S., Smith S.J., Stroup D.F., Steinberg K.K., Mueller P.W., Thacker S.B. // *International J. Epidemiology*. 2002. V. 31. № 1. P. 59–70.
20. Trabetti E. // *J. Appl. Genet.* 2008. V. 49. № 3. P. 267–282.
21. Торшин И.Ю., Громова О.А., Лиманова О.А., Егорова Е.Ю., Сардарян И.С., Юдина Н.В., Гришина Т.Р., Федотова Л.Э., Галустян А.Н., Малявская С.И., Волков А.Ю., Калачева А.Г., Рудаков К.В., Косенко И.М., Семенов В.А. // *Педиатрия. Журн. им. Г.Н. Сперанского*. 2015. № 6.
22. Жилева Т.В., Македонская О.Г., Чумаков М.Э., Благодаринова А.С., Мазо Г.Э. // *Социальная и клиническая психиатрия*. 2019. Т. 29. № 2. С. 14–22.
23. Roffman J.L., Petruzzi L.J., Tanner A.S., Brown H.E., Eryilmaz H., Ho N.F., Giegold M., Silverstein N.J., Bottiglieri T., Manoach D.S., Smoller J.W., Henderson D.C., Goff D.C. // *Mol. Psychiatry*. 2017. V. 23. № 2. P. 316.
24. Araki A., Hosoi T., Orimo H., Ito H. // *Metabolism*. 2005. V. 54. P. 809–814.
25. Hayden M.R., Tyagi S.C. // *Nutr J.* 2004. V. 3. P. 4.
26. Liu T., Lin J., Ju T., Chu L., Zhang L. // *Mol. Cell. Biochem.* 2015. V. 406. P. 139–149.
27. Sethi M.K., Zaia J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 409. № 2. P. 379–394.
28. Болдырев А.А., Брюшкова Е.А., Владыченская Е.А. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. №. 2. С. 160–168.
29. Ивлева К.Д., Баирова Т.А., Калужная О.В., Первушина О.А., Рычкова Л.В., Колесникова Л.И., Колесников С.И. // *Acta Biomedica Scientifica*. 2016. № 3–2. P. 109.
30. Choi J.H., Yates Z., Veysey M., Heo Y.R., Luccock M. // *Prev. Nutr. Food Sci.* 2014. V. 19. № 4. P. 247–260.

Biochemical Markers of Folate Metabolism Disturbances in Schizophrenia in Russian Population

I. V. Semennov^a, A. S. Pyatoykina^b, Ya. S. Zagryazhskaya^b, G. V. Rukavishnikov^c,
E. D. Kasyanov^c, T. V. Zhilyaeva^a, A. S. Blagonravova^a, and G. E. Mazo^c

^aPrivolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

^bClinical Psychiatric Hospital №1 of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

^cBekhterev National Medical Research Center for Psychiatry and Neurology, St. Petersburg, Russia

A number of foreign studies have shown that hyperhomocysteinemia is revealed in schizophrenia more often than in the general population. On the one hand, it can be an integral marker of folate metabolism disturbances (as a result of vitamin deficiency and/or genetic predisposition), on the other hand, it can be involved in the pathogenesis of the disease through several possible molecular mechanisms. In Russia, there were no

similar studies, in addition, there are conflicting results of studies on genetic factors involved in the metabolism of folate and homocysteine in schizophrenia. The purpose of this study was to evaluate the association between the serum levels of homocysteine, folate, and cobalamin and schizophrenia in the European part of Russia (Nizhny Novgorod region). A biochemical study of serum homocysteine, folate and cobalamin (B12) levels was performed in randomly selected 50 patients with schizophrenia and 36 healthy volunteers. Homocysteine concentration was measured on a Cobas analyzer (Roche Diagnostics) using an enzymatic assay. The determination of folate and B12 levels was performed by the method of chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA, Architect, Abbott lab. S.A.). As a result, it was found that the level of homocysteine was significantly higher in patients than in the control group ($p = 0.0041$), and folate level was significantly lower ($p = 0.0072$). The level of homocysteine in patients of the studied sample has a weak negative statistically significant correlation with both the level of folate ($\rho = -0.38$; $p = 0.0063$) and with the level of B12 ($\rho = -0.36$; $p = 0.0082$). Homocysteine is significantly higher in men than in women in the entire studied sample ($Z = -2.1068$, $p = 0.0351$), as well as in subgroups of patients ($Z = -2.11$; $p = 0.035$) and healthy control ($z = 3.4$; $p = 0.00067$). The data obtained indicate the need for further study of hyperhomocysteinemia and other biochemical markers of folate metabolism disorders in schizophrenia in the Russian population and the development of ways to correct them to optimize the treatment of this mental disorder.

Keywords: schizophrenia, hyperhomocysteinemia, cobalamin, folate, personified psychiatry