

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

- Влияние нейротрансмиттеров на функционирование обонятельных сенсорных нейронов
Е. В. Бигдай, В. О. Самойлов 699
-

Экспериментальные статьи

- Влияние лактата на митохондриальную активность в клетках эндотелия при остром токсическом действии бета-амилоида *in vitro*
Я. В. Горина, Е. Д. Хилажева, А. И. Мосягина, Е. В. Харитонова, М. Р. Капкаева, Е. В. Стельмашук, Н. К. Исаев, Н. А. Розанова, А. Б. Салмина 712
- Расчетный индекс на основе уровней активности изоформ бутирилхолинэстеразы для подтверждения диагноза мягкого когнитивного снижения
Д. И. Козлова, В. В. Хижа, Л. В. Аносова, А. А. Королькова, Д. С. Васильев, А. В. Рыбаков, К. В. Пахомов, А. Б. Шишкин, С. В. Сумина, М. Ф. Баллюзек 725
- Изменение скоростных показателей мозгового кровотока крыс при старении
О. П. Горшкова 736
- Влияние оксида азота на электрическую активность тройничного нерва и состояние тучных клеток твердой мозговой оболочки крысы
К. С. Коралёва, С. О. Свитко, Д. А. Нурмиева, О. Ш. Гафуров, А. Д. Буглинина, Г. Ф. Ситдикова 745
- Влияние метаболических нарушений и стрептозотоцинового диабета на церебральную циркуляцию у крыс, содержащихся на высокожировой диете
И. Б. Соколова 762
- Анализ роли D₁- и D₂-рецепторов дофамина в модуляции функции осмотического концентрирования у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови
П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова 771
- Оценка стабильности референсных генов в мозге крыс при проведении антиоксидантной и противовоспалительной терапии в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии
А. П. Швари, А. Д. Дёмина, М. В. Захарова, А. А. Коваленко, М. О. Грязнова, А. М. Ищенко, А. В. Зайцев 781
-
-

CONTENTS

Reviews

- The Role of Neurotransmitters in the Functioning of Olfactory Sensory Neurons
E. V. Bigday and V. O. Samoilov 699
-

Experimental Articles

- Influence of Lactate on Mitochondrial Activity in Endothelial Cells
in Experimental *in vitro* with Acute Toxic Effect of Beta-Amyloid
Ya. V. Gorina, E. D. Khilazheva, A. I. Mosyagina, E. V. Kharitonova, M. R. Kapkaeva,
E. V. Stelmashuk, N. K. Isaev, N. A. Rozanova, and A. B. Salmina 712
- A New Diagnostic Index Based on the Activity of Butyrylcholinesterase Isoforms
for Laboratory Confirmation of Mild Cognitive Impairment Diagnosis
D. I. Kozlova, V. V. Khizha, L. V. Anosova, A. A. Korolkova, D. S. Vasilev,
A. V. Rybakov, K. V. Pakhomov, A. B. Shishkin, S. V. Sumina, and M. F. Ballyzek 725
- Changes in the Velocity Indicators of Cerebral Blood Flow in Rats during Aging
O. P. Gorshkova 736
- Effects of Nitric Oxide on the Electrical Activity of the Trigeminal Nerve
and the Mast Cell Morphology of Rats
K. S. Koroleva, S. O. Svitko, D. A. Nurmieva, O. Sh. Gafurov,
A. D. Buglinina, and G. F. Sitdikova 745
- Effect of Metabolic Disorders and Streptozotocin Diabetes on Cerebral Circulation
in Rats on a High-Fat Diet
I. B. Sokolova 762
- Analysis of Dopamine D₁- and D₂-Receptors Effect on Renal Osmoregulatory
Function in Rats with Different Blood Vasopressin Level
P. D. Pravikova and L. N. Ivanova 771
- The Reference Gene Validation in the Brain of Rats during Antioxidant
and Anti-Inflammatory Treatment in the Lithium–Pilocarpine Model
of Temporal Epilepsy
A. P. Schwarz, A. V. Dyomina, M. V. Zakharova, A. A. Kovalenko,
M. O. Gryaznova, A. M. Ischenko, and A. V. Zaitsev 781
-
-

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ
ОБОНЯТЕЛЬНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ**

© 2022 г. Е. В. Бигдай¹, *, В. О. Самойлов¹

¹*Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: bigday50@mail.ru*

Поступила в редакцию 09.02.2022 г.

После доработки 28.03.2022 г.

Принята к публикации 19.04.2022 г.

В статье анализируются литературные данные, из которых следует, что обонятельные сенсорные нейроны объединяют в себе свойства, типичные для обонятельных рецепторных клеток, предназначенных для восприятия запахов, и свойства, присущие нейронам ЦНС. Это обуславливается тем, что в их мембране экспрессируются не только молекулярные белки-рецепторы, специфические для данной пахучей молекулы, но и рецепторы к таким нейротрансмиттерам, как глутамат, дофамин, серотонин, адреналин, ацетилхолин. Они играют нейрозащитную и модулирующую роль в функционировании рецепторного аппарата обонятельного анализатора. Кроме того, экспрессия и функциональность рецепторов к этим нейротрансмиттерам в обонятельных сенсорных нейронах представляет особый интерес, поскольку они вовлекаются в патогенез таких заболеваний, как шизофрения, болезнь Паркинсона и другие психоневрологические заболевания.

Ключевые слова: обонятельные сенсорные нейроны, рецепторы NMDA, дофаминовые рецепторы, мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, серотониновые рецепторы, глутамат

DOI: 10.31857/S0869813922060012

Обонятельные сенсорные нейроны являются первичночувствующими рецепторными клетками нервного происхождения, у которых аксон простирается к обонятельной луковице, а дендрит – к апикальной поверхности обонятельного эпителия. На его конце образована обонятельная булава, увенчанная подвижными обонятельными жгутиками [1]. Их двигательная активность обеспечивается двумя молекулярными системами – тубулин-динеиновой и актин-миозиновой. Причем, первая из них вовлечена в неупорядоченные движения жгутиков в отсутствие одорантов, а вторая обеспечивает хемотаксис обонятельных жгутиков в градиенте концентрации одорантов в обонятельной слизи [2]. В их мембранах экспрессируются молекулярные рецепторы, специфические к данному пахучему веществу, и компоненты механизмов обонятельной трансдукции, включающие G-белки, сопряженные либо со специфической для обоняния аденилатциклазой 3-го типа (АЦ3) [3], либо с фосфолипазой C, с образованием вторичных посредников, в результате чего открываются циклонуклеотид- или фосфоинозитид-зависимые каналы. Одоранты, относящиеся к острым и гнилостным запахам, не взаимодействуют с ольфакторными рецепторами в мембране обонятельных жгутиков. Они легко

проникают через плазматическую и митохондриальную мембраны и ингибируют клеточное дыхание. Это означает, что механизмы обонятельной трансдукции гетерогенны [4]. Таким образом, обонятельные жгутики выполняют хемо- и механо-сенсорную функции, что, как мы полагаем, является одним из механизмов высокой обонятельной чувствительности [5]. Взаимодействие одорантов с рецепторами приводит к формированию рецепторного потенциала в обонятельных жгутиках и, в конечном итоге, к генерации в аксонах обонятельных сенсорных нейронов потенциалов действия, посылающих информацию о запахе в обонятельную луковицу. Отсюда аксоны нейронов второго порядка посылают прямые проекции в ипсилатеральную периформную и энторинальную кору, миндалину, гиппокамп и орбитофронтальную кору, а также через переднюю комиссуру к обонятельным кортикальным зонам в контрлатеральном полушарии, обеспечивая интеграцию обонятельных входов с левой и правой стороны [6].

Поскольку обонятельная сенсорная система анатомически наиболее тесно связана с височно-лимбическими и лобными долями, которые в значительной степени вовлечены в различные нейродегенеративные заболевания и лежат в основе социальных, эмоциональных и когнитивных аномалий, исследования обоняния могут служить адекватным инструментом для оценки структурной и функциональной целостности патоморфологических нервных субстратов. Однако обонятельные сенсорные нейроны не получают обратных связей из обонятельных центров, и их чувствительность не регулируется ЦНС. Поэтому важно понимать механизмы, влияющие на состояние рецепторного отдела обонятельного анализатора, а следовательно, и на его чувствительность. Понимание этих механизмов является актуальным, поскольку они могут представлять особый не только теоретический, но и практический интерес для нейробиологии.

1. ЭКСПРЕССИЯ ИОНОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (IRs), УЧАСТВУЮЩИХ В ОБОНЯНИИ

Из анализа данных литературы следует, что в цилиарной мембране обонятельных сенсорных нейронов обнаруживаются рецепторы не только к обонятельным стимулам. Известно, что ионотропные рецепторы глутамата (iGluR), представляющие собой ионные каналы, управляемые лигандами, обеспечивают химическую связь между нейронами в синапсах. Вместе с тем вариант подсемейства iGluR, Ionotropic Receptors (IRs), был недавно предложен как новое семейство обонятельных рецепторов, которые в отличие от других типов ионотропных глутаматных рецепторов непосредственно участвуют в обнаружении пахучих веществ и локализуются в обонятельных жгутиках, а не в синапсах. Анализ экспрессии IRs в основном органе обоняния (антенне) плодовой мушки, *Drosophila melanogaster*, которая в данном исследовании использовалась в качестве модели, выявил, что отдельные обонятельные сенсорные нейроны экспрессируют от 2 до 5 различных генов IRs. Показано, что IRs действуют в комбинации, состоящей из трех субъединиц, включая рецепторы, специфичные для одоранта, и один или два корорецептора. Образование гетеромерных IRs комплексов необходимо и достаточно для распознавания запаха и локализации обонятельных жгутиков. По мнению Abuin с соавт. [7], IRs представляют собой интересный пример молекулярной гомологии между периферическими сенсорными и постсинаптическими рецепторами. Из-за сходства с химическими синапсами их предложили в качестве модели для характеристики механизмов активации и регуляции нейронов внешними раздражителями. Авторы полагают, что изначально общий предок этих рецепторов сохранил функцию чувствительного к глутамату рецептора в дистальных дендритных мембранах перифе-

рических сенсорных нейронов аналогично роли iGluR в постсинаптических мембранах интернейронов [7]. Эти рецепторы обнаружены также у москитов [8].

Следовательно, несмотря на то, что обонятельные IRs обнаружены только у насекомых, результаты могут помочь улучшить наше понимание IRs-опосредованной обонятельной трансдукции.

2. В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНАХ ЭКСПРЕССИРУЮТСЯ NMDA-РЕЦЕПТОРЫ

Молекулярная гомология между периферическими сенсорными и постсинаптическими рецепторами проявляется и в том, что в цилиарной мембране локализуются рецепторы к нейротрансмиттерам, которые непосредственно не участвуют в восприятии пахучего стимула. Они выполняют другую роль в обонянии. Значительное внимание привлекают NMDAR из-за их широкого распространения и функциональной роли, включая развитие мозга, нейронную пластичность, когнитивные функции, эксайтотоксичность, а также участие во многих нейродегенеративных заболеваниях.

Глутамат является возбуждающим нейротрансмиттером в обонятельной системе, а субъединицы его рецептора к N-метил-D-аспартату (NMDA) [GluN1 (NR1), GluN2A (NR2A) и GluN2B (NR2B)] экспрессируются как в синапсах обонятельной луковицы, так и в обонятельном эпителии человека и животных [9] и играют важную модулирующую роль в развитии и функциональной активности обоняния. Эти выводы были подтверждены данными многих исследований. Особенно это относится к NR3A-субъединице, сохраняющей свое функциональное значение у взрослых млекопитающих (мышей и крыс). Показаны относительно высокие уровни мРНК NR3A в обонятельной системе по сравнению с другими частями мозга взрослого человека, что указывает на ее важную роль не только у новорожденных, но и у взрослых. И следует отметить, что NR3A-субъединица, помимо обонятельной луковицы, экспрессируется в обонятельных сенсорных нейронах, модулируя опосредованное NMDA-рецепторами обнаружение запахов, влияя, таким образом на восприятие самых низких интенсивностей одорантов [10].

NR3A-субъединица в составе с другими субъединицами NMDAR модифицирует его гетеромерную структуру, образуя “нетрадиционный” NMDAR с новыми кинетическими свойствами. Обладая сродством связывания с глицином более чем в 650 раз более высоким, чем у NR1, NR3A образует функциональные возбуждающие глициновые рецепторы с низкой проницаемостью для ионов Ca^{2+} . Низкая проницаемость для этого иона обеспечивает NR3A нейропротективные свойства, обусловленные уменьшением притока Ca^{2+} в клетки и, следовательно, предотвращение гибели нейронов при сверхактивации Ca^{2+} -проницаемого NMDAR и избыточного поступления кальция в цитозоль [11–15].

Такая нейрозащитная функция NMDAR важна для обонятельных сенсорных нейронов. Как известно, апикальная часть рецепторных нейронов подвергается напрямую воздействию окружающей среды. В обонятельную слизь, в которую погружены обонятельные жгутики (а именно в них осуществляется процесс обонятельной трансдукции), проникают не только пахучие вещества в физиологических концентрациях, но и одоранты в чрезмерных концентрациях, токсические вещества, а также глутамат и другие нейротрансмиттеры. Можно предположить, что при взаимодействии с глутаматом NMDAR, подобно нейронам гиппокампа, активирует аденилатциклазу в обонятельных сенсорных нейронах, увеличивая внутриклеточную концентрацию цАМФ [16]. В результате в обонятельных клетках возникает чрезмерная активация аденилатциклазы 3-го типа посредством двух механизмов — через обонятельные рецепторы и NMDAR, вызывая чрезмерную активность

обонятельных сенсорных нейронов, приводящую к их гибели даже при низких концентрациях одорантов из-за накопления Ca^{2+} в них. Однако благодаря нейропротекторной функции NMDAR, содержащие NR3A-субъединицу, способны обеспечить защитную функцию для рецепторных клеток обонятельного анализатора в экстремальных условиях [17, 18].

Кроме того, известно, что в обонятельном эпителии на протяжении всей жизни млекопитающих, включая человека, протекает нейрогенез, пополняющий популяцию зрелых обонятельных сенсорных нейронов, способных обеспечивать полноценное обонятельное восприятие специфических пахучих молекул [19]. Однако деляция или дефицит NR3A вызывает дефицит продукции зрелых обонятельных сенсорных нейронов и потерю способности обнаружения специфических пахучих веществ. Таким образом, вероятно, экспрессия NR3A в обонятельной структуре может быть важным регулятором, опосредующим созревание рецепторных клеток и восприятие запаха в обонятельной системе [10].

Известно также, что количество зрелых обонятельных сенсорных нейронов определяет нейрональную активность центрального аппарата обонятельного анализатора [20]. Неслучайно ослабление функций NMDAR при некоторых психических (например, шизофрения) заболеваниях сопровождается снижением обоняния, причиной которого является уменьшение количества зрелых обонятельных сенсорных нейронов в обонятельном эпителии [21, 22].

Таким образом, NMDR, содержащий NR3A-субъединицу, помимо обонятельной луковицы экспрессируется в обонятельных сенсорных нейронах взрослых животных и человека, модулируя опосредованное NMDA-рецепторами обнаружение запахов, влияя, таким образом, на восприятие самых низких интенсивностей одорантов. Кроме того, она выполняет нейрозащитную функцию, имеющую большое значение для обонятельных сенсорных нейронов. Экспрессия NMDR, содержащих NR3A-субъединицу в обонятельной структуре, может быть важным регулятором, опосредующим созревание рецепторных клеток и восприятие запаха в обонятельной системе.

3. ЭКСПРЕССИЯ не-NMDA-РЕЦЕПТОРОВ В ОБОНЯТЕЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ

В обонятельном эпителии экспрессируется подгруппа субъединиц не-NMDA-рецепторов, принадлежащих к ионотропным глутаматным рецепторам в сенсорных нейронах. В отличие от обонятельных ионотропных глутаматных рецепторов (см. раздел 2), эти рецепторы не реагируют на обонятельные стимулы. Глутамат и другие аминокислоты, как известно, не являются одорантами для млекопитающих. Кроме аксонов, в дендритных булавах люминальной поверхности обонятельных сенсорных нейронов, которые, как известно, не получают синаптических входов, обнаруживается высокое содержание субъединицы каинатных рецепторов KA2. Присутствие ионотропных глутаматных рецепторов в дендритной булаве оказалось совершенно неожиданным. Наличие этой субъединицы в обонятельном эпителии на специализированных обонятельных булавах обонятельных сенсорных нейронов указывает на то, что эти подтипы каинатных рецепторов могут выполнять новые, несинаптические, функции. Хотя физиологическое значение этих рецепторов пока неясно, полагают, что эти каинат-селективные возбуждающие рецепторы на дендритах обонятельных сенсорных нейронов выполняют новые функции, связанные с модуляцией механизма обонятельной трансдукции в ответ на локально высвобождаемые возбуждающие аминокислоты [23].

Поэтому обонятельные сенсорные нейроны могут, вероятно, служить полезной модельной системой для исследования не-NMDA-рецепторов в механизмах обонятельной сенсорной трансдукции, что может иметь как теоретическое, так и практическое значение для нейробиологии.

4. ДОФАМИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНАХ

В обонятельных сенсорных нейронах и их нервных окончаниях, как аксонах, так и дендритов, у человека и грызунов обнаружены рецепторы к дофамину [24–26]. Экспрессия и функциональность дофаминовых рецепторов в этих клетках представляют особый интерес для нейробиологов, поскольку эти рецепторы вовлекаются в патогенез таких заболеваний, как шизофрения, болезнь Паркинсона и другие психоневрологические заболевания [9].

Существует несколько подтипов рецепторов к дофамину [27]. По сравнению с обонятельной луковицей, которая содержит и подтип рецепторов D2 и популяцию рецепторов D3, обонятельная слизистая оболочка экспрессирует только рецепторы D2 [22, 28]. Показано, что дофамин через D2-рецепторы оказывает морфогенетические эффекты, которые проявляются в его способности индуцировать или апоптоз или обонятельный тип дифференцировки в линии обонятельных клеток [29]. Дофамин через D2-рецепторы действует непосредственно на клетки обонятельного эпителия, играя важную роль в созревании обонятельных сенсорных нейронов. Обнаружено, что параллельно с действием на обработку информации о запахе, дофамин выполняет функцию фактора роста в перманентном нейрогенезе, происходящем в обонятельном эпителии. Все эти открытия подчеркивают новую роль в качестве фактора роста этой молекулы, в основном известной как нейротрансмиттер [24].

Sogonas с соавт. [22] и Koster с соавт. [26] показали, что дофамин модулирует потенциал-зависимые ионные каналы в обонятельных рецепторных клетках. В работах на тонких срезах обонятельного эпителия лягушек по исследованию электро-механического сопряжения в механизме двигательной активности обонятельных жгутиков было продемонстрировано наличие функциональных потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов L типа в мембране этих жгутиков [30]. Активация D2-рецептора приводит к ингибированию Ca^{2+} каналов L-типа в обонятельных сенсорных нейронах. Модулируя эти каналы, дофамин изменяет реакции на запахи, снижая возбудимость обонятельных сенсорных нейронов в отсутствие стимуляции запахом, действуя, таким образом, уже на уровне первичных сенсорных нейронов [31].

Рецепторы дофамина D2 связаны с ингибирующим G-белком G_i , ингибирующим аденилатциклазу. В механизм обонятельной трансдукции вовлекается аденилатциклаза III типа. Действуя через D2-рецепторы, локализующиеся в мембране дендритов обонятельных рецепторных нейронов, дофамин может снижать активность этого фермента, снижая уровни цАМФ и уменьшая реакцию на одоранты, а также ингибировать токи через потенциал-управляемые ионные каналы, уменьшая активируемый гиперполяризацией ток (I_h) [32, 33]. Таким образом, дофамин модулирует обонятельную чувствительность на уровне обонятельных сенсорных нейронов, и присутствие дофаминовых рецепторов в обонятельных рецепторных нейронах предполагает, что чувствительность к запаху может модулироваться нейротрансмиттерами на уровне первичных сенсорных нейронов.

Помимо модулирующей роли в обонянии, дофамин обладает и нейрозащитным эффектом на уровне рецепторного аппарата обонятельного анализатора. Показано, что концентрация дофамина в носовой слизи увеличивается в ответ на вредные раздражители и травмы в обонятельном эпителии [31, 34, 35]. Опосредованное D2-рецептором подавление потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов может быть новым нейрозащитным механизмом для обонятельных сенсорных нейронов. Таким образом, D2-рецепторы совместно с NMDA-рецепторами, содержащими NR3A-субъединицу, снижая поступление кальция в цитозоль через потенциал-зависимые и циклонуклео-

тид-зависимые каналы соответственно, объединяют свои усилия в борьбе за сохранение жизнедеятельности обонятельных сенсорных нейронов в чрезвычайных условиях.

Таким образом, дофамин модулирует обонятельную чувствительность на уровне обонятельных сенсорных нейронов. Это означает, что чувствительность к запаху может модулироваться нейротрансмиттерами на уровне первичных сенсорных нейронов.

5. СЕРОТОНИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, ЛОКАЛИЗОВАННЫЕ В ОБОНЯТЕЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ

Помимо дофаминовых, в культуре обонятельного эпителия человека экспрессируются серотониновые рецепторы 5HTR2C, сопряженные с G-белком, что делает эти клетки жизнеспособными инструментами для исследования рецепторов 5HT у конкретных индивидуумов для изучения нервно-психических заболеваний [9].

В обонятельном эпителии мышей обнаружены подтипы серотониновых рецепторов 5-HT1A и 5-HT1B. Причем, рецепторы подтипа 5-HT1A локализируются в клеточных телах нейронов, а рецепторы 5-HT1B – в дендритах и выступающих в люминальную полость дендритных булавах обонятельных рецепторных нейронов. Полагают, что рецепторы 5-HT1A и 5-HT1B могут играть роль в модуляции периферических обонятельных сигналов путем регулирования выходящих калиевых токов. Снижение калиевых токов под действием экзогенного серотонина на обонятельных сенсорных нейронах, по-видимому, обуславливают повышенную возбудимость обонятельных сенсорных нейронов при активации серотониновых рецепторов. Однако точные механизмы взаимодействия серотонина и рецепторов 5-HT1A и 5-HT1B в обонятельных сенсорных нейронах пока не ясны [36].

6. ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ К АЦЕТИЛХОЛИНУ И АДРЕНАЛИНУ В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНАХ

В обонятельном эпителии локализируются мускариновые рецепторы [37, 38]. Методом визуализации кальция в мембране обонятельных жгутиков обонятельных сенсорных нейронов, непосредственно взаимодействующих с обонятельным стимулом и обеспечивающих обонятельную трансдукцию, были выявлены мускариновые ацетилхолиновые рецепторы типа 3 (M3-R), которые модулируют обонятельные ответы [39, 40].

По сведениям Jiang с соавт. [31], M3-R физически взаимодействуют с обонятельными рецепторами, образуя стабильные гетеромеры. При этом активация M3-R ингибирует рекрутирование β -аррестина-2 к обонятельному рецептору, что приводит к усилению индуцированного запахом ответа в рецепторных нейронах. Таким образом, ацетилхолин, выделяемый в обонятельную слизь, может играть роль в модулировании обработки обонятельной информации уже на начальных этапах передачи сигнала в обонятельной системе, при этом отсутствие экспрессии M3-R приводит к ослаблению функции обонятельных сенсорных нейронов у млекопитающих. Эти данные убедительно подтверждают роль ацетилхолина в регуляции обоняния на периферии и повышают вероятность того, что ацетилхолин может влиять на реакции этих нейронов на обонятельную стимуляцию.

Об этом свидетельствует и способность M3-R взаимодействовать не с одним, а с большим количеством обонятельных рецепторов, воспринимающих разнообразные специфические пахучие молекулы. Состояние активации M3-R является важным фактором, определяющим его влияние на механизм ольфакторной трансдукции, поскольку M3-R усиливает функцию обонятельных рецепторов, и его состояние активации влияет на опосредованную запахом активацию в обонятельных сенсорных нейронах. Это обуславливается тем, что обонятельные рецепторы и

M3-R вместе усиливают активность аденилатциклазы 3 в отсутствие одорантов. То есть обонятельные сенсорные нейроны уже готовы воспринимать запахи с меньшей концентрацией и при этом увеличивать концентрацию цАМФ, достаточную для генерации рецепторного потенциала, способного генерировать потенциалы действия и активировать нейроны обонятельной луковицы [40].

Совместная цилиарная локализация M3-R и обонятельных рецепторов в обонятельных сенсорных нейронах является примером, в котором необонятельный рецептор, сопряженный с G-белком, экспрессируясь вместе с обонятельным рецептором, может существенно изменить активность и эффективность большого количества обонятельных рецепторов.

Учитывая обширную иннервацию обонятельной слизистой оболочки холинергическими парасимпатическими нейронами, можно предположить, что секреторный ацетилхолин может активировать мускариновые рецепторы на обонятельных сенсорных нейронах. При этом уже низкая концентрация ацетилхолина, независимо от того, доступен ли он постоянно или высвобождается при стимуляции обонятельного рецептора, может улучшить обонятельный ответ.

Кроме того, известно, что люди и животные имеют низкие пороги обнаружения запахов в процессе обучения. Эта обонятельная тренировка модулируется ацетилхолином. В результате модуляции функции молекулярных обонятельных рецепторов ацетилхолином в цилиарных мембранах обонятельных клеток снижаются пороги генерации спайков в аксонах этих клеток, увеличивая таким образом возбудимость обонятельного анализатора [41]. Вероятно, ацетилхолин, оказывая прямое влияние на активацию обонятельных рецепторов, может тем самым способствовать обонятельному обучению уже на молекулярном уровне.

Полагают, что механизм этого усиления объясняется тем, что взаимодействие между обонятельными рецепторами и M3-R изменяет конформацию обонятельного рецептора или приводит к лиганд-индуцированному изменению его конформации, что улучшает связывание с лигандом. Другая возможность заключается том, что гетеромеры M3-R и обонятельные рецепторы могут связываться с G-белками более эффективно, чем мономерные рецепторы.

Полагают также, что M3-R не только модулируют активность обонятельных рецепторов, но и вовлекают свои собственные внутриклеточные сигнальные системы. Например, активация в обонятельных жгутиках специфических для данного запаха обонятельных рецепторов, может активировать M3-R, которые затем переключат сигнальную трансдукцию с аденилатциклазного на фосфоинозитидный сигнальной путь [38].

В обонятельных жгутиках экспрессируются также рецепторы к адреналину. Полагают, что он тоже модулирует функцию обонятельных рецепторов [42]. Считают, что адреналин усиливает контраст обонятельного восприятия, напрямую влияя на кодирование сигнала обонятельных рецепторных клеток, снижая пороги кальциевого тока T-типа в них посредством цАМФ-зависимого фосфорилирования [43].

Таким образом, ацетилхолин, выделяемый в обонятельную слизь, может играть роль в модулировании обработки обонятельной информации уже на начальных этапах передачи сигнала в обонятельной системе. Ацетилхолин, оказывая прямое влияние на активацию обонятельных рецепторов, может тем самым способствовать обонятельному обучению уже на молекулярном уровне, а адреналин усиливает контраст обонятельного восприятия.

7. ИСТОЧНИКИ ПОЯВЛЕНИЯ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СЛИЗИ

Откуда в обонятельной слизи берутся нейротрансмиттеры? Слизь на поверхности обонятельной слизистой оболочки, как известно, представляет собой среду, в

которой происходят перерецепторные процессы, связанные с обонятельной трансдукцией [44]. В обонятельной слизистой оболочке всех позвоночных, кроме рыб, располагаются Боуменовы железы. Они состоят из ацинусов, которые содержат слизистые или серозные клетки, или те и другие, а также протоки, которые проходят сквозь обонятельный эпителий для доставки секрета к эпителиальной поверхности. В обонятельном эпителии всех позвоночных присутствуют опорные клетки, которые могут участвовать в регуляции состава обонятельной слизи посредством микропиноцитозной секреции и эндоцитоза.

Секреция желез Боумена и вазомоторная активность в обонятельной слизистой оболочке регулируются нервными элементами, внешними по отношению к первичным обонятельным нейронам. Нервные волокна содержат множество нейроактивных пептидов и имеют несколько мишеней в обонятельной слизистой оболочке. Ультраструктурные исследования нервных окончаний в обонятельной слизистой оболочке продемонстрировали наличие адренергического, холинергического и пептидергического воздействия на железы, кровеносные сосуды и меланоциты в собственной пластинке и пептидергические окончания в обонятельном эпителии. Нервными истоками внешних нервных волокон и окончаний являются тройничный, терминальный и вегетативный нервы [45].

Вегетативная стимуляция вызывает выделение слизи. Кровеносные сосуды и железы обонятельной подслизистой оболочки позвоночных получают симпатическую и парасимпатическую иннервацию. Волокна, содержащие тирозингидроксилазу и предположительно адренергические симпатические аксоны, простираются до базальной мембраны и присутствуют внутри желез [46]. За счет парасимпатической иннервации выделяется ацетилхолин, который активен при низких уровнях стресса, например, во время кормления [40].

Посредством флуоресцентных маркеров, методами иммуоцитохимии и конфокальной кальциевой визуализации в срезах обонятельного эпителиа выявили несколько подклассов микровиллярных клеток, осуществляющих паракриновую регуляцию в обонятельном эпителии. В частности, идентифицирована субпопуляция микровиллярных клеток, коэкспрессирующих TRPM5 (терморесепторы) и холинацетилтрансферазу (ChAT, фермент, необходимый для синтеза ацетилхолина) [47, 48]. Используя трансгенных мышей и иммуоцитохимическое мечение, выявили, что эти клетки являются холинергическими. Они реагируют на запах и тепловую (холодовую) стимуляцию мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} и высвобождают ацетилхолин в обонятельный эпителий [47].

Это означает, что ацетилхолин может синтезироваться и высвободиться ими локально для модуляции активности соседних опорных клеток и обонятельных сенсорных нейронов. Эти микровиллярные клетки не иннервируются тройничным нервом. Интересно, что обонятельные сенсорные нейроны помимо M3-R, которые усиливают активность обонятельных рецепторов [38], экспрессируют ингибирующие M4-R и M5-R [47]. Так обеспечивается внутренний механизм связи внешней стимуляции с холинергической модуляцией деятельности в обонятельном эпителии.

В настоящее время неизвестно, переносятся ли нейропептиды или нейротрансмиттеры из капилляров в обонятельный эпителий через опорные клетки. Однако учитывая, что многие из этих молекул эффективны при наномолярных концентрациях, такой механизм доставки кажется правдоподобным. Более того, многие из сигнальных молекул, присутствующих в опорных клетках и высвобождаемых ими, сами модулируют чувствительность обонятельных сенсорных нейронов.

Встает вопрос — каким образом дофамин оказывается в апикальной области обонятельных сенсорных нейронов? О его наличии в этой области свидетельствуют данные анализа обонятельной слизи, собранной с поверхности обонятельного

эпителия при попадании вредных раздражителей в носовую полость. Оказалось, что эти раздражители вызывают временное повышение концентрации дофамина в слизи [28]. Уровни симпатических нейромедиаторов дофамина и норадреналина в слизи, покрывающей обонятельный эпителий, временно повышаются после стимуляции CO_2 [46]. Обонятельная слизистая оболочка получает внешнюю иннервацию от различных афферентов тройничного нерва, которые проникают через базальную мембрану и доходят до апикальной части нейроэпителия [49]. Это предполагает, что дофамин, высвобождаемый из этих волокон во время вредной стимуляции, диффундирует к рецепторам на обонятельных сенсорных нейронах, минуя специализированные дофаминергические синапсы [25, 26, 46].

Дофамин и норадреналин высвобождаются из симпатических нервных окончаний около ацинарных клеток Боуменовых желез в собственной пластинке обонятельной слизистой оболочки. Показано, что катехоламины присутствуют в носовой слизи и что их концентрации увеличиваются при стимуляции тройничного нерва. Базальные концентрации достигают 25.5 ± 13.1 нМ для норадреналина и 10.9 ± 3.9 нМ для дофамина. При 5-минутной стимуляции тройничного нерва концентрация норадреналина увеличивается до 88.6 ± 33.7 нМ, а дофамина — до 31.7 ± 13.1 нМ. Кроме того, вероятно, катехоламины высвобождаются в слизь посредством симпатической иннервации обонятельной слизистой оболочки, поскольку удаление верхнего шейного ганглия снижает концентрацию дофамина и норадреналина в обонятельной слизистой оболочке на 75% и больше. Концентрация дофамина в носовой слизи крыс после стимуляции тройничного нерва является физиологически значимой. Как уже упоминалось, способность дофамина десенсибилизировать обонятельные сенсорные нейроны может быть особенно важной в присутствии вредных химикатов. Сенсibilизация этих нейронов может контролироваться факторами, влияющими на мотивационное состояние, такими как голод или стресс [34].

Таким образом, нейротрансмиттеры попадают в обонятельную слизь различными путями, включающими тройничный, терминальный и вегетативный нервы, симпатический и парасимпатический пути, функционирование микровиллярных клеток, осуществляющих паракриновую регуляцию в обонятельном эпителии. Эти клетки являются холинергическими и высвобождают ацетилхолин в обонятельный эпителий. Многие из сигнальных молекул присутствуют в опорных клетках и высвобождаются ими. Взаимодействуя со своими рецепторами на мембране обонятельных сенсорных нейронов, нейротрансмиттеры модулируют их чувствительность, а следовательно, чувствительность обонятельной сенсорной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в обонятельных сенсорных нейронах экспрессируются не только молекулярные белки-рецепторы, специфические для данной пахучей молекулы, но и рецепторы к таким нейромедиаторам, как глутамат, дофамин, серотонин, адреналин, ацетилхолин. Изложенные литературные данные позволяют сделать заключение, что обонятельные сенсорные нейроны могут быть источником, а также мишенью для определенных нейромодуляторов. В результате обработка сигналов, происходящая на уровне первичных сенсорных нейронов, регулируется внешними влияниями и внутренним состоянием организма и динамически приспосабливается к ним.

Нейротрансмиттерные пути в обонятельных сенсорных нейронах представляют особый не только теоретический, но и практический интерес для нейробиологии, поскольку они вовлекаются в патогенез различных психоневрологических расстройств и нейродегенеративных заболеваний. Это позволяет связать функцио-

нальные и молекулярные характеристики нервных клеток с клиническими характеристиками пациентов, от обонятельного нейроэпителия которых получают культуры обонятельных рецепторных нейронов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014–2020 гг. (ГП-14, раздел 63).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанные с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Сбор данных, перевод статей, написание и редактирование статьи (Е.В.Б.); идея статьи и сбор данных (В.О.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McClintock TS, Khan N, Xie C, Martens JR* (2020) Maturation of the Olfactory Sensory Neuron and Its Cilia. *Chemical Senses* 45: 805–822. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjaa070>
2. *Самойлов ВО, Бигдай ЕВ, Руденко ЯН, Бекусова ВВ, Дудич БА* (2008) Две молекулярные системы подвижности обонятельных жгутиков лягушки. *Биофизика* 53: 997–100. [*Samoilov VO, Bigdai EV, Dudich BA, Rudenko YN, Bekusova VV* (2008) Two molecular motility systems of the frog olfactory cilia. *Biophysics* 53: 539–543. (In Russ)].
3. *Qiu L, LeBel R, Storm DR, Chen X* (2016) Type 3 adenylyl cyclase: a key enzyme mediating the cAMP signaling in neuronal cilia. *J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 8: 95–108.
4. *Бигдай ЕВ* (2004) Гетерогенность молекулярных механизмов обонятельной рецепции. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 90: 790–800. [*Bigdai EV* (2004) Heterogeneity of molecular mechanisms of olfactory reception. *Russ J Physiol* 90: 790–800. (In Russ)].
5. *Бигдай ЕВ, Самойлов ВО* (2018) Хемосенсорные и механосенсорные функции обонятельных жгутиков. *Биофизика* 63: 1146–1153. [*Bigdai EV, Samojilov VO* (2018) Chemosensory and mechanosensory functions of olfactory cilia. *Biophysics* 63: 1146–1153. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0006350918060027>
6. *Nagayama S, Enerva A, Fletcher ML, Masurkar AV, Igarashi KM, Mori K, Chen WR* (2010) Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse main olfactory system. *Front Neural Circuits* 4: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncir.2010.00120>
7. *Abuin L, Bargeton B, Ulbrich MH, Isacoff EY, Kellenberger S, Benton R* (2011) Functional Architecture of Olfactory Ionotropic Glutamate Receptors. *Neuron* 69: 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.042>
8. *Chen Q, Man Y, Li J, Pei D, Wu W* (2017) Olfactory Ionotropic Receptors in Mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 54: 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx063>
9. *Borgmann-Winter KE, Rawson NE, Wang H-Y, Wang H, MacDonald ML, Ozdener MH, Yee KK, Gomez G, Xu J, Bryant B, Adamek G, Mirza N, Pribitkin E, Hahn C-G* (2009) Human olfactory epithelial cells generated in vitro express diverse neuronal characteristics. *Neuroscience* 158: 642–653. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.059>
10. *Lee JH, Wei L, Deveau TC, Gu X, Yu SP* (2016) Expression of the NMDA receptor subunit GluN3A (NR3A) in the olfactory system and its regulatory role on olfaction in the adult mouse. *Brain Struct Funct* 221: 3259–3273. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1099-3>
11. *Kehoe LA, Bernardinelli Y, Muller D* (2013) GluN3A: An NMDA Receptor Subunit with Exquisite Properties and Functions. *Neural Plasticity* 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/145387>
12. *Tong G, Takahashi H, Tu S, Shin Y, Talantova M, Zago W, Xia P, Nie Z, Goetz T, Zhang D, Lipton SA, Nakanishi N* (2008) Modulation of NMDA Receptor Properties and Synaptic Transmission by the NR3A Subunit in Mouse Hippocampal and Cerebrocortical Neurons. *J Neurophysiol*

- 99: 122–132.
<https://doi.org/10.1152/jn.01044.2006>
13. *Nakanishi N, Tu S, Shin Y, Cui J, Kurokawa T, Zhang D, Chen H-SV, Tong G, Lipton SA* (2009) Neuroprotection by the NR3A Subunit of the NMDA Receptor. *J Neurosci* 29: 5260–5265.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1067-09.2009>
 14. *Henson MA, Larsen RS, Lawson SN, Pérez-Otano I, Nakanishi N, Lipton SA, Philpot BD* (2012) Genetic Deletion of NR3A Accelerates Glutamatergic Synapse Maturation. *PLoS One* 7: e42327.
 15. *Low C-M, Wee KS-L* (2010) New Insights into the Not-So-New NR3 Subunits of N-Methyl-D-aspartate Receptor: Localization, Structure, and Function. *Mol Pharmacol* 78: 1–11.
<https://doi.org/10.1124/mol.110.064006>
 16. *Chetkovich DM, Sweatt JD* (1993) NMDA Receptor Activation Increases Cyclic AMP in Area CA 1 of the Hippocampus via Calcium/Calmodulin Stimulation of Adenylyl Cyclase. *J Neurochem* 61: 1933–1942.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb09836.x>
 17. *Lee JH, Wei ZZ, Chen D, Gu X, Wei L, Yu SP* (2015) A neuroprotective role of the NMDA receptor subunit GluN3A (NR3A) in ischemic stroke of the adult mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 308: C570–C577.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00353.2014>
 18. *Kleene SJ* (2008) The Electrochemical Basis of Odor Transduction in Vertebrate Olfactory Cilia. *Chem Senses* 33P: 839–859.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjn048>
 19. *Hanh C-G, Han L-Y, Rawson NE, Mirza N, Borgmann-Winter K, Lenox RH, Arnold SE* (2005) In Vivo and In Vitro Neurogenesis in Human Olfactory Epithelium. *J Compar Neurol* 483: 154–163.
<https://doi.org/10.1002/cne.20424>
 20. *Pantazopoulos H, Boyer-Boiteau A, Holbrook EH, Jang W, Hahn C-G, Arnold SE, Berretta S* (2013) Proteoglycan abnormalities in olfactory epithelium tissue from subjects diagnosed with schizophrenia. *Spec Sect Negat Symptoms* 150: 366–372.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.08.013>
 21. *Arnold SE, Han L-Y, Moberg PJ, Turetsky BI, Gur RE, Trojanowski JQ, Hahn C-G* (2001) Dysregulation of olfactory receptor neuron lineage in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 58: 829–835.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.9.829>
 22. *Javitt DC* (2007) Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-d-Aspartate Receptors, and Dopamine–Glutamate Interactions. *Integrat Neurobiol Schizophr* 78: 69–108.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)78003-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)78003-5)
 23. *Thukral V, Chikaraishi D, Hunter DD, Wang JKT* (1997) Expression of non-N-Methyl-D-Aspartate glutamate receptor Subunits in the olfactory epithelium. *Neuroscience* 79: 411–424.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00699-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00699-9)
 24. *Fe'ron F, Vincent A, Mackay-Sim A* (1999) Dopamine promotes differentiation of olfactory neuron in vitro. *Brain Res* 845: 252–259.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01959-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01959-9)
 25. *Coronas V, Srivastava LK, Liang J-J, Jourdan F, Moyse E* (1997) Identification and localization of dopamine receptor subtypes in rat olfactory mucosa and bulb: a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach. *J Chem Neuroanat*. 12: 243–257.
[https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(97\)00215-9](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(97)00215-9)
 26. *Koster NL, Norman AB, Richtand NM, Nickell WT, Puche AC, Pixley YSK, Shipley MT* (1999) Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J Comp Neurol* 411: 666–673.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19990906\)411:4<666::aid-cne10>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19990906)411:4<666::aid-cne10>3.0.co;2-s)
 27. *Martel JC, McArthur SG* (2020). Dopamine Receptor Subtypes, Physiology and Pharmacology: New Ligands and Concepts in Schizophrenia. *Front Pharmacol* 11.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01003>
 28. *Carli M, Kolachalam S, Aringhieri S, Rossi M, Giovannini L, Maggio R, Scarsell M* (2018) Dopamine D2 Receptors Dimers: How can we Pharmacologically Target Them? *Current Neuropharmacol* 16: 222–230.
<https://doi.org/10.2174/1570159X15666170518151127>
 29. *Coronas V, Féron F, Hen R., Sicard G, Jourdan F, Moyse E* (1997) In Vitro Induction of Apoptosis or Differentiation by Dopamine in an Immortalized Olfactory Neuronal Cell Line. *J Neurochem* 69: 1870–1881.
 30. *Бигдай ЕВ, Фуфачев ДК, Петров ПР, Самойлов ВО* (2017) Механизмы электромеханического и электрохимического сопряжений в обонятельных жгутиках лягушки (*Rana temporaria*). *Биофизика* 62: 311–318. [*Bigdaj EV, Samojlov VO, Fufachev DK, Petrov PR* (2017) Mechanisms of electromechanical and electrochemical coupling in olfactory cilia of the frog

- (*Rana temporaria*). *Biophysics* 62: 240–246. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0006350917020051>
31. Hegg CC, Lucero MT (2004) Dopamine Reduces Odor- and Elevated-K⁺-Induced Calcium Responses in Mouse Olfactory Receptor Neurons In Situ. *J Neurophysiol* 91: 1492–1499.
 32. Vargas G, Lucero MT (1999) Dopamine modulates inwardly rectifying hyperpolarization-activated current (I_h) in cultured rat olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol* 81: 149–158.
<https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.1.149>
 33. Yano H, Cai N-S, Xu M, Verma RK, Rea W, Hoffman AF, Shi L, Javitch JA, Bonci A, Ferré S (2018) Gs- versus Golf-dependent functional selectivity mediated by the dopamine D1 receptor. *Nat Commun* 9: 486.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02606-w>
 34. Lucero MT, Squires A (1998) Catecholamine concentrations rat nasal mucus are modulated by trigeminal stimulation of the nasal cavity. *Brain Res* 807: 234–236.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00825-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00825-7)
 35. Coronas V, Krantic S, Jourdan F, Moysé E (1999) Dopamine receptor coupling to adenylyl cyclase in rat olfactory pathway: a combined pharmacological-radioautographic approach. *Neuroscience* 90: 69–78.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00460-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00460-6)
 36. Gao S, Guo X, Liu T, Liu J, Chen W, Xia Q, Chen Y, Tang Y (2013) Serotonin Modulates Outward Potassium Currents in Mouse Olfactory Receptor Neurons. *Physiol Res* 62: 455–462.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.932413>
 37. Hedlund B, Shepherd GM (1983) Biochemical studies on muscarinic receptors in the salamander olfactory epithelium. *FEBS Lett* 162: 428–431.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80801-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80801-1)
 38. Li YR, Matsunami H (2011) Activation state of the M3 muscarinic acetylcholine receptor modulates mammalian odorant receptor signaling. *Sci Signal* 4: ra1.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2001230>
 39. Hall RA (2011) Autonomic modulation of olfactory signaling. *Sci Signal* 4: Pe1.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2001672>
 40. Jiang Y, Li YR, Tian H, Ma M, Matsunami H (2015). Muscarinic Acetylcholine Receptor M3 Modulates Odorant Receptor Activity via Inhibition of β -Arrestin-2 Recruitment. *Nat Commun* 6: 6448.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7448>
 41. Ohkuma M, Kawai F, Miyachi E (2013) Acetylcholine enhances excitability by lowering the threshold of spike generation in olfactory receptor cells. *J Neurophysiol* 110: 2082–2089.
<https://doi.org/10.1152/jn.01077.2012>
 42. Omura M, Grosmaître X, Ma M, Mombaerts P (2014) The β 2-adrenergic receptor as a surrogate odorant receptor in mouse olfactory sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 58: 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.10.010>
 43. Kawai F, Kurahashi T, Kaneko A (1999) Adrenaline enhances odorant contrast by modulating signal encoding in olfactory receptor cells. *Nat Neurosci* 2: 133–138.
 44. Gänger S, Schindowski K (2018) Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics* 10: 116.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030116>
 45. Getchell ML, Getchell TV (1992) Fine Structural Aspects of Secretion and Extrinsic Innervation in the Olfactory Mucosa. *Microsc Res Techn* 23: 111–127.
<https://doi.org/10.1002/jemt.1070230203>
 46. Lucero MT (2013) Peripheral Modulation of Smell: Fact or Fiction? *Semin Cell Dev Biol* 24: 58–70.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.09.001>
 47. Ogura T, Szebenyi SA, Krosnowski K, Sathyanesan A, Jackson J, Lin W (2011) Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells. *J Neurophysiol* 106: 1274–1287.
<https://doi.org/10.1152/jn.00186.2011>
 48. Lin W, Margolskee R, Donnert G, Hell SW, Restrepo D (2007) Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2471–2476.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0610201104>
 49. Schaefer ML, Bottger B, Silver WL, Finger TE (2002). Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: a potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli. *J Comp Neurol* 444: 221–226.
<https://doi.org/10.1002/cne.10143>

The Role of Neurotransmitters in the Functioning of Olfactory Sensory Neurons**E. V. Bigday^{a, *} and V. O. Samoilo^a**^a*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*^{*}*e-mail: bigday50@mail.ru*

The article analyzes the literature data, from which it follows that olfactory sensory neurons (OSN) combine the properties typical of olfactory receptor cells designed to perceive odors and the properties inherent in CNS neurons. This is due to the fact that in the olfactory flagella expressing molecular receptor proteins specific for this odorous molecule, receptors for neurotransmitters such as glutamate, dopamine, serotonin, adrenaline, and acetylcholine are also localized. They play a neuroprotective and modulating role in the functioning of the receptor apparatus of the olfactory analyzer. In addition, the expression and functionality of receptors for these neurotransmitters in OSN is of particular interest, as they are implicated in the pathogenesis of diseases such as schizophrenia, Parkinson's disease, and other neuropsychiatric diseases.

Keywords: olfactory sensory neurons, NMDA receptors, dopamine receptors, muscarinic acetylcholine receptors, serotonin receptors, glutamate

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ЛАКТАТА НА МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
В КЛЕТКАХ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ
БЕТА-АМИЛОИДА *IN VITRO*

© 2022 г. Я. В. Горина¹, Е. Д. Хилажева¹, А. И. Мосягина¹, Е. В. Харитоновна^{1, *},
М. Р. Капкаева², Е. В. Стельмашук², Н. К. Исаев², Н. А. Розанова², А. Б. Салмина²

¹Красноярский государственный медицинский университет им. профессора
В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Красноярск, Россия

²Научный центр неврологии, Москва, Россия

*E-mail: kharitonova1988@mail.ru

Поступила в редакцию 21.02.2022 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 11.05.2022 г.

Установлено, что при остром токсическом действии бета-амилоида *in vitro* присутствие лактата во внеклеточном пространстве в дозозависимой манере снижает активность митохондрий в клетках эндотелия, блокада лактатных монокарбоксилатных транспортеров (МСТ) обладает таким же эффектом, но стимуляция лактатных GPR81-рецепторов на этих клетках вызывает увеличение активности митохондрий. Это позволяет предположить, что высокая концентрация лактата во внеклеточном пространстве подавляет активность митохондрий в клетках эндотелия, но это не связано с активностью GPR81-рецепторов. Вероятнее всего, эффекты GPR81 реализуются в присутствии более низких концентраций внеклеточного лактата. Поскольку развитие болезни Альцгеймера сопровождается снижением экспрессии изоформ МСТ, определяющих транспорт и метаболизм лактата в нервных клетках, в комплексе с полученными нами данными дисрегуляция МСТ-транспортеров при болезни Альцгеймера способствует развитию митохондриальной дисфункции, а воспроизведение эффектов внеклеточного лактата путем активации GPR81-рецепторов частично компенсирует такое нарушение.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, церебральный эндотелий, митохондриальная активность, флоретин

DOI: 10.31857/S0869813922060024

Болезнь Альцгеймера является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний у пожилых людей, эта болезнь сопровождается рядом прогрессирующих когнитивных нарушений и потерей памяти, которым как правило предшествует внеклеточное отложение в головном мозге бета-амилоида (A β) в виде диффузных и нерастворимых бляшек [1]. Одним из наиболее распространенных и ярко выраженных патологических признаков болезни Альцгеймера является церебральная амилоидная ангиопатия, которая развивается за счет отложения нерастворимого A β в артериях, артериолах и вокруг стенок капилляров [2, 3]. При этом повреждение церебральных микрососудов приводит к запуску комплекса патологических событий, включающего гипоперфузию, нейровоспаление, нарушение структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера

(ГЭБ) и окислительный стресс, что в совокупности способствует прогрессированию нейродегенерации [4].

Как известно, церебральные эндотелиальные клетки, занимающие центральное место в структуре ГЭБ, контролируют постоянство химического состава внутренней среды головного мозга, регулируя транспорт ионов и молекул через ГЭБ и модулируя мозговой кровоток [5]. При этом важно отметить, что эндотелиальные клетки капилляров головного мозга содержат в 2–4 раза больше митохондрий, чем любые другие эндотелиальные клетки организма, это обусловлено высокой потребностью в активном энергетическом метаболизме и выживании [6], а также более высокой восприимчивостью к апоптозу и нарушениям в структуре белков плотных контактов в условиях гипоксии [7]. Это объясняет тот факт, что изменения структуры и функции митохондрий в церебральных эндотелиальных клетках вызывают клеточную дисфункцию, потерю целостности ГЭБ и воспаление, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [8–10].

Примечательно, что содержание митохондрий в значительной мере снижается в мозге мышей с болезнью Альцгеймера [11–13], а поскольку митохондрии представляют собой ключевой источник энергии для клеток головного мозга, повреждение митохондрий может являться одним из самых ранних событий в развитии болезни Альцгеймера [14]. Более того, показано, что митохондрии играют решающую роль в сигнальных путях, опосредующих повреждение церебрального эндотелия при развитии болезни Альцгеймера, ассоциированной с церебральной амилоидной ангиопатией [15].

Ранее предполагалось, что лактат является конечным продуктом метаболизма, однако накопленные экспериментальные данные указывают на то, что лактат является важным источником энергии и сигнальной молекулой для нейронов [16], это позволяет предположить, что гомеостаз лактата может иметь решающее значение для функции мозга. Интересен и тот факт, что согласно недавно проведенному исследованию, циркулирующий лактат может являться основным субстратом цикла трикарбоновых кислот во всех тканях, кроме головного мозга [17]. При этом полное распределение лактата между тканями, за исключением головного мозга, указывает на то, что головной мозг имеет отличительную метаболическую микросреду, это подразумевает важную роль церебральных эндотелиальных клеток в поддержании гомеостаза лактата. Ряд исследований показал, что эндотелиальные клетки головного мозга экспрессируют монокарбоксилатный транспортер 1 (MCT1), который транспортирует лактат, пируват и кетоновые тела через клеточные мембраны, что указывает на способность эндотелиоцитов обеспечивать как транспорт лактата в мозг, так и его отток для поддержания лактатного гомеостаза [18, 19].

Ранее нами было показано, что активация лактатных рецепторов GPR81 в церебральном эндотелии стимулирует митохондриальный биогенез *in vitro*, это дает возможность предположить, что метаболическое взаимодействие между астроцитами и эндотелиоцитами посредством продукции лактата в астроцитах, его транспортом за счет MCT к церебральным эндотелиоцитам и действием через рецепторы GPR81 может играть существенную роль в регуляции структурно-функциональной целостности ГЭБ [20].

Необходимо отметить, что не до конца известны механизмы, с помощью которых Аβ в церебральном эндотелии нарушает митохондриальные метаболические процессы, такие как цикл трикарбоновых кислот, дыхательная цепь переноса электронов и окислительное фосфорилирование, а также механизмы его абберантного влияния на ферменты. При этом было высказано предположение, согласно которому наличие общих структурно-функциональных особенностей ферментов может обуславливать схожие эффекты Аβ на метаболические процессы и продук-

цию АТФ как в церебральной эндотелии, так и в клетках нейрональной и астроглиальной природы [21].

Более того, в настоящее время недостаточно ясно, какое влияние на функцию митохондрий в эндотелиальных клетках головного мозга при нейродегенерации альцгеймеровского типа оказывает уровень лактата.

Цель работы — изучить влияние лактата на митохондриальную активность в клетках эндотелия при остром токсическом действии бета-амилоида *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение первичной монокультуры эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга in vitro

В работе использовались первичная культура клеток церебрального эндотелия, полученная из крыс линии Wistar. Животных содержали в клетках со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь. Исследования на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Исследования выполняли после утверждения заявки и протокола на использование лабораторных животных для исследования на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола №3 от 27.10.2020 г.). Общее количество животных $n = 2$.

Выделение церебральных эндотелиоцитов проводилось по модифицированному протоколу Liu и соавт. [22]. Выделение мозга с удалением мозговых оболочек и крупных церебральных сосудов осуществлялось с помощью роллинга на фильтровальной бумаге. Выделяли кору головного мозга и удаляли крупные сосуды в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия). Мелконарезанную кору головного мозга центрифугировали в течение 3 мин при 150 g, после чего добавляли к осадку в двукратном объеме 25%-ный бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma, США), подвергали механической диссоциации пипеткой на 5 мл, полученную взвесь клеток центрифугировали в течение 10 мин при 600 g при комнатной температуре. После центрифугирования проводили забор самого нижнего слоя осадка и перенос в новую коническую пробирку на 15 мл. Этапы механической диссоциации и центрифугирования повторяли трижды, после чего проводилась ферментативная обработка осадка в 0.1%-ном растворе коллагеназы II (ПанЭко, Россия) в течение 35 мин при 37°C с периодическим перемешиванием. Далее осадок умеренно ресуспензировали и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. После центрифугирования осадок ресуспензировали в модифицированной среде Игла (DMEM-F12, GIBCO Invitrogen Corporation, США), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Австрия), 2 мМ глутамин (glutaMAX, Gibco, Великобритания), 16.6 мМ глюкозы, и высаживали на пластиковую чашку Петри диаметром 40 мм (Медполимер, Россия), покрытую матригелем. Смену среды проводили дважды в неделю. После образования монослоя эндотелиальные клетки пересаживали в 96-луночные культуральные планшеты (Eppendorf, Германия).

Исследование влияния концентрации лактата на митохондриальную активность в эндотелиоцитах при остром токсическом действии бета-амилоида in vitro

При достижении 90%-ной конfluenceности монослоя эндотелиальных клеток производили смену среды и добавляли лактат натрия в концентрациях 2.5, 5 и 10 мМ. Также в часть экспериментальных лунок одновременно с лактатом натрия добавляли Аβ1-42 в конечной концентрации 100 нМ.

Таким образом, были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) Контроль;
- 2) Контроль + 2.5 мМ лактат;
- 3) Контроль + 5 мМ лактат;
- 4) Контроль + 10 мМ лактат;
- 5) A β 1-42;
- 6) A β 1-42 + 2.5 мМ лактат;
- 7) A β 1-42 + 5 мМ лактат;
- 8) A β 1-42 + 10 мМ лактат.

Через сутки культивирования клеток с модуляторами производилась оценка интенсивности флуоресценции митохондрий с использованием TMRE (Sigma, США). TMRE селективно накапливается в активных митохондриях и позволяет детектировать мембранный потенциал митохондрий в живых клетках. В лунки добавляли TMRE в рабочей концентрации 200 нМ и инкубировали в течение 15 мин при 37°C, после чего отмывали лунки модифицированным раствором Рингера–Локка 3 раза. Оценку интенсивности флуоресценции митохондрий проводили с использованием системы клеточной визуализации EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Исследование влияния модуляторов GPR81 на клетки эндотелия при остром токсическом действии бета-амилоида in vitro

При достижении 90%-ной конфлюентности монослоя эндотелиальных клеток производили смену среды и добавляли химические модуляторы: A β 1-42 в конечной концентрации 100 нМ и 3Cl-5OH-ВА (агонист рецепторов лактата GPR81) в конечной концентрации 500 мкМ.

Были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) Контроль;
- 2) A β 1-42;
- 3) 3Cl-5OH-ВА;
- 4) A β 1-42 + 3Cl-5OH-ВА.

Инкубацию с A β 1-42 проводили в течение 48 ч, инкубацию с 3Cl-5OH-ВА – в течение 24 ч, после чего оценивали интенсивность флуоресценции митохондрий с помощью TMRE с использованием системы клеточной визуализации EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Исследование влияния модуляторов MCT-транспортёров на клетки эндотелия при остром токсическом действии бета-амилоида in vitro

При достижении 90%-ной конфлюентности монослоя эндотелиальных клеток производили смену среды и добавляли химические модуляторы: лактат натрия в конечной концентрации 10 мМ, флоретин (блокатор монокарбоксилатных транспортёров MCT1, MCT4) в конечной концентрации 100 мкМ, A β 1-42 в конечной концентрации 100 нМ.

Были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) Лактат;
- 2) Лактат + Флоретин;
- 3) Лактат + A β 1-42;
- 4) Лактат + Флоретин + A β 1-42.

Инкубацию с A β 1-42 проводили в течение 48 ч, инкубацию с лактатом натрия и флоретином – в течение 24 ч, после чего оценивали интенсивность флуоресценции митохондрий с помощью TMRE с использованием системы клеточной визуализации EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США).

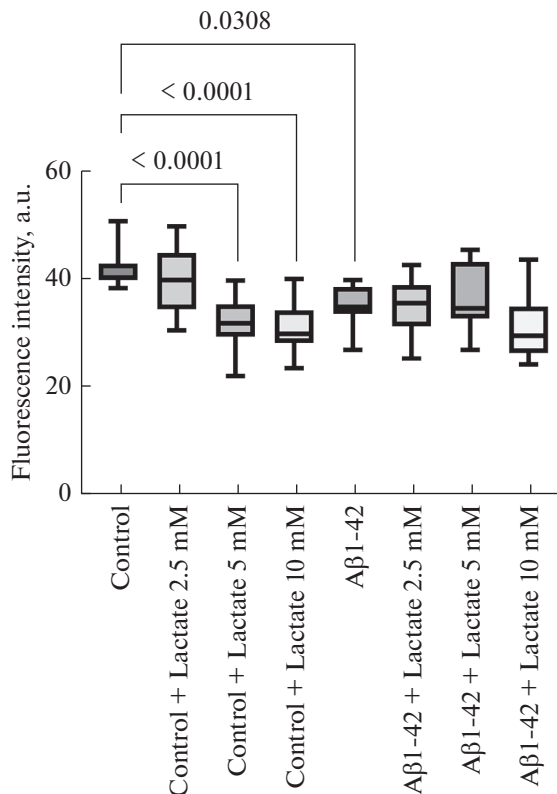


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции митохондрий в эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга при воздействии лактата натрия в концентрациях 2.5, 5 и 10 мМ в культуральной среде, а также в присутствии Аβ1-42. Данные представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана; [Q1; Q3] интерквартильный размах, p – уровень значимости, U – критерий Манна–Уитни.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ GraphPad Prizm 8.0.1 (версия 8.0, США) и Statplus Professional (AnalystSoft Inc, США), сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 и GraphPad 6.0 (США). Критерий Колмогорова–Смирнова использовали для оценки нормальности распределения. При отсутствии нормальности распределения применяли U -критерий Манна–Уитни. При сравнении более двух групп применяли непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла–Уоллиса).

Различия принимали значимыми при $p \leq 0.05$. Результаты представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана; [Q1; Q3] интерквартильный размах, p – уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами было выявлено, что культивирование эндотелиальных клеток в присутствии Аβ1-42 приводило к снижению интенсивности флуоресценции митохондрий по сравнению с группой контроля (рис. 1). При изучении влияния внеклеточного лактата на активность митохондрий в клетках эндотелия найдено, что добавление

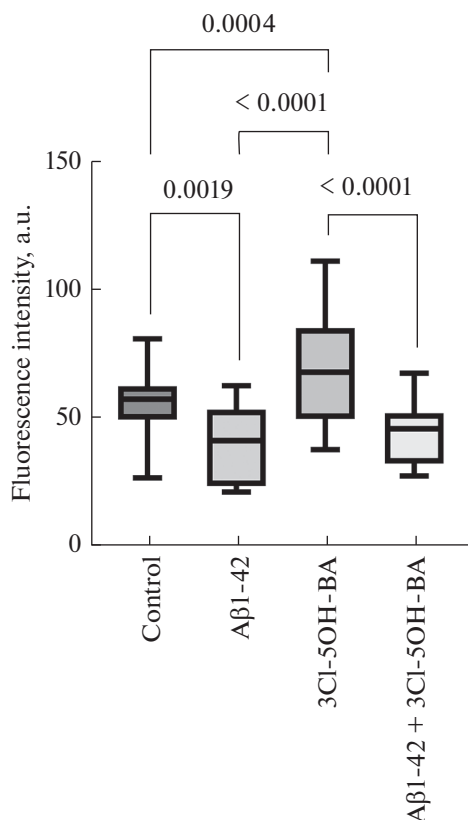


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции митохондрий в эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга при воздействии Aβ1-42 и агониста рецепторов лактата GPR81 – 3Cl-5OH-BA. Данные представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана; [Q1; Q3] интерквартильный размах, *p* – уровень значимости, U-критерий Манна–Уитни.

лактата в концентрации 5 и 10 мМ, но не 2.5 мМ приводило к статистически значимому снижению интенсивности флуоресценции митохондрий в группе культивирования клеток в питательной среде (рис. 1). В группе Aβ1-42 присутствие лактата нивелировало влияние Aβ1-42 на митохондриальную активность (рис. 1).

Для оценки вклада рецепторов лактата GPR81 в выявленные нами эффекты лактата было изучено действие 3Cl-5OH-BA, агониста рецепторов лактата GPR81, на активность митохондрий в клетках эндотелия.

Активация рецепторов лактата GPR81 в группе 3Cl-5OH-BA приводила к статистически значимому увеличению интенсивности флуоресценции митохондрий в эндотелиальных клетках по сравнению с группой контроля (рис. 2). Присутствие в среде культивирования Aβ1-42 вызывало статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции митохондрий в эндотелиальных клетках по сравнению с группой контроля. Также была отмечена тенденция, свидетельствующая о том, что активация рецепторов лактата GPR81 нивелирует токсическое воздействие Aβ1-42 на митохондриальную активность, однако при межгрупповом сравнении статистически значимых различий не выявлено (рис. 2).

В ходе исследования влияния модуляторов МСТ-транспортеров лактата на активность митохондрий в клетках эндотелия нами установлено, что присутствие

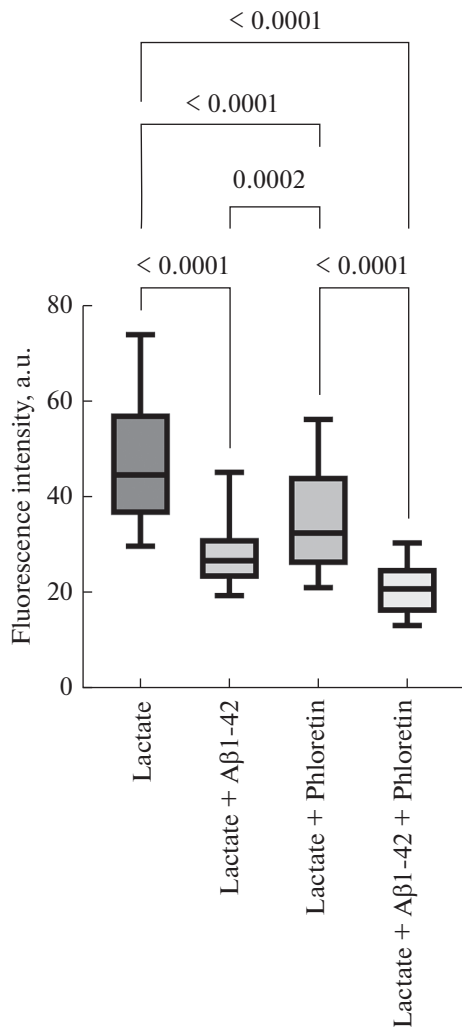


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции митохондрий в эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга при воздействии лактата натрия, флоретина и Aβ1-42. Данные представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана; [Q1; Q3] интерквартильный размах, *p* – уровень значимости, U-критерий Манна–Уитни.

Aβ1-42 и блокирование МСТ-транспортеров флоретином приводило к статистически значимому снижению интенсивности флуоресценции митохондрий в эндотелиальных клетках, однако подавляющее действие флоретина на митохондриальный биогенез являлось менее выраженным по сравнению с Aβ1-42 (рис. 3). Совместное воздействие модуляторов вызывало выраженное снижение интенсивности флуоресценции митохондрий (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что метаболические изменения в нервных клетках головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера могут предшествовать таким ключевым нейропатологическим событиям, как отложение амилоидных бляшек и формирование

нейрофибрилярных белков [23]. Все большее количество экспериментальных данных свидетельствует о том, что снижение интенсивности гликолиза и нарушение функций митохондрий, особенно в отношении регуляции окислительного фосфорилирования, вероятно, являются значимыми факторами в развитии и прогрессировании болезни Альцгеймера [24, 25].

Согласно гипотезе митохондриального каскада, мутантные митохондриальные гены, которые предрасполагают к снижению скорости митохондриального дыхания, могут выступать в качестве триггеров развития абберантного функционирования митохондрий при болезни Альцгеймера [14]. Так, у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера патологические изменения функций митохондрий наблюдаются еще до отложения А β [26]. Аналогичная ситуация установлена и в моделях *in vitro*, а именно выраженные нарушения структурно-функциональной целостности митохондрий и окислительный стресс в условиях отсутствия А β [27], что дает дополнительные доказательства ключевой роли митохондриальной дисфункции в этиологии болезни Альцгеймера.

Важно отметить и то, что нарушение гликолиза также наблюдается на ранних стадиях у пациентов с болезнью Альцгеймера, в частности, ярко выраженное снижение аэробного гликолиза в тех областях головного мозга, которые в наибольшей степени подвержены повреждающему действию А β [28], а также в тех областях, где наблюдаются высокие уровни накопления гиперфосфорилированного тау-белка [29].

Примечательным является тот факт, что отобранные линии нервных клеток, устойчивые к токсическому эффекту А β , демонстрируют гиперэкспрессию киназы пируватдегидрогеназы — фермента, подавляющего митохондриальное дыхание и переводящего клетку в режим аэробного гликолиза, на фоне повышения активности лактатдегидрогеназы А и продукции лактата [30], что коррелирует со снижением уровня активных форм кислорода. При этом химическое или генетическое ингибирование лактатдегидрогеназы А в значительной мере повышает чувствительность клеток к токсическому действию А β . Такое переключение метаболизма с митохондриального дыхания на аэробный гликолиз, известного как эффект Варбурга [31], частично обусловлено действием HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1- α , фактор, индуцируемый гипоксией 1- α), который приводит к снижению митохондриального дыхания и связанной с этим продукции активных форм кислорода, что в свою очередь увеличивает устойчивость нервных клеток к апоптозу [32, 33]. Более того, сверхэкспрессия киназы пируватдегидрогеназы или лактатдегидрогеназы А в культуре нервных клеток, выделенных из ткани головного мозга крыс, в значительной мере увеличивает устойчивость к А β и другим нейротоксинам за счет снижения потенциала митохондриальной мембраны и продукции активных форм кислорода. При этом стоит отметить, что клетки потребляют меньший объем кислорода, сохраняя уровень АТФ как в контрольных условиях культивирования, так и после добавления А β [30].

Интересно, что добавление субстратов окислительной энергии пирувата и 3- β -гидроксибутирата в условиях *in vitro* и *in vivo* уменьшало развитие А β -индуцированной дисфункции нейронов за счет активации дыхательной цепи переноса электронов в митохондриях в условиях развития болезни Альцгеймера [34].

Таким образом, в ходе наших исследований установлено, что в физиологических условиях возрастание концентраций внеклеточного лактата привело к торможению митохондриальной активности. Однако в условиях токсического действия бета-амилоида *in vitro* присутствие внеклеточного лактата повысило резистентность митохондрий к токсическому действию А β 1-42, что может быть связано со способностью лактата вызывать торможение окислительного фосфорилирования и образования активных форм кислорода, тем самым способствуя повышению устойчивости клеток эндотелия к апоптозу при развитии болезни Альцгеймера.

Наличие лактат-чувствительного рецептора GPR81 в головном мозге [35] указывает на то, что лактат является не только метаболитом и энергетическим субстратом, но и сигнальной молекулой, которая может модулировать активность нейронов посредством различных механизмов. По данным одного из исследований [36], церебральный GPR81 экспрессируется преимущественно в постсинаптических мембранах синапсов возбуждающих нейронов, а также, хотя и в меньшей степени, в перисинаптических астроглиальных отростках и в гематоэнцефалическом барьере, в частности, в эндотелиальных клетках и периваскулярных астроцитарных отростках. Дальнейшие исследования продемонстрировали присутствие GPR81 в мозжечке, гиппокампе и коре головного мозга мыши [36], а также в изолированных кортикальных астроцитах крыс и мышей [37], что указывает на способность лактата реализовывать сигнальные эффекты посредством активации рецепторов в различных областях ЦНС. Следовательно, рецепторы GPR81 могут опосредовать эффекты лактата в контексте реализации синаптической функции, энергетического метаболизма и мозгового кровотока [35, 38].

Согласно недавно проведенному исследованию [37], стимуляция внеклеточным L-лактатом и селективным агонистом GPR81 – 3-хлор-5-гидроксibenзойной кислотой (3Cl-5OH-BA) подобно стимуляции адренергических рецепторов, повышает внутриклеточный уровень цАМФ и L-лактата в астроцитах за счет активации аденилатциклазы. Интересно, что 3Cl-5OH-BA также повышал содержание цитозольного цАМФ и в астроцитах, выделенных из ткани головного мозга мышей, нокаутных по L-лактат-специфическому рецептору GPR81, это указывает на существование нового L-лактат-рецепторноподобного механизма, не зависящего от активности рецептора GPR81, посредством которого происходит активация аэробного гликолиза и продукция L-лактата по механизму положительной обратной связи.

Известно, что митохондриальный цАМФ влияет на физиологию митохондрий, а именно митохондриальные микродомены цАМФ могут интегрировать вне- и внутримитохондриальные стимулы для регуляции большинства митохондриальных функций [39]. Структурно-функциональные нарушения митохондрий, развивающиеся при болезни Альцгеймера [40], сопровождаются aberrантной передачей сигналов цАМФ [41], что в свою очередь приводит к реализации ряда эффектов, а именно стимуляции ионных каналов, которые блокируют активность нейронной сети и вызывают стимуляцию экспрессии белка-предшественника амилоида и амилоидогенного процессинга [42].

Таким образом, в ходе нашего исследования установлено, что активация лактатных рецепторов вызывала повышение интенсивности митохондриального дыхания в клетках эндотелия, в то время как воздействие A β 1-42 приводило к митохондриальной дисфункции. Это дает возможность предположить, что активация GPR81-рецепторов лактата при амилоидопатии может быть эффективна для коррекции энергетического дефицита, вызванного действием A β на митохондрии.

Как известно, монокарбоксилатные транспортеры, в частности MCT1, в ЦНС впервые были функционально идентифицированы на эндотелиальных клетках ГЭБ [43]. Значительная экспрессия MCT1 в сосудах головного мозга во взрослом возрасте предполагает их способность проходить через ГЭБ и выступать в роли ключевых энергетических субстратов для мозга, что особенно важно в условиях дисметаболизма глюкозы при развитии болезни Альцгеймера [44, 45].

Примечательно, что MCT2 также обнаружен на внутриклеточной мембране митохондрий нейронов [46, 47], что в комплексе с присутствием изоформы лактатдегидрогеназы В указывает на непосредственное окисление лактата в митохондриях [48], это в свою очередь дает возможность рассматривать монокарбоксилатные транспортеры как часть митохондриального комплекса, который способствует проникновению и использованию окислительных субстратов.

Более того, поглощение L-лактата через МСТ сопровождается котранспортом протонов, вызывая внутриклеточное закисление [49], что может модулировать энергетический метаболизм головного мозга путем ингибирования фосфофруктокиназы — гликолитического фермента, чувствительного к небольшим изменениям pH [50].

Интересными являются результаты недавно проведенного исследования [51], согласно которому активация МСТ2 *in vivo* улучшала функцию митохондрий и в значительной мере снижала прогрессирование когнитивных нарушений за счет усиления АМРК-опосредованного митохондриального биогенеза.

В целом можно заключить, что блокирование транспорта лактата МСТ-транспортерами оказывает угнетающее действие на митохондриальную активность в церебральном эндотелии, приводя к энергетическому дефициту в митохондриях. Наблюдаемая при этом митохондриальная дисфункция еще более усугубляется при действии Аβ, обладающего токсическим эффектом в отношении митохондриальной активности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-2547.2020.7) с использованием ресурсной базы ЦКП МКТ КрасГМУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента — А.Б.С.

Сбор данных — Е.Д.Х., А.И.М., Е.В.С., Н.К.И., Н.А.Р.

Обработка данных — Е.Д.Х., А.И.М., Я.В.Г.

Написание и редактирование манускрипта — Я.В.Г., Е.В.Х.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scheltens P, Blennow K, Breteler MB, Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Flier WMV (2016) Alzheimer's disease. *Lancet* 388(10043): 505–517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1)
2. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacska BJ, Frosch MP, Viswanathan A, Greenberg SM (2017) Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain* 140(7): 1829–1850. <https://doi.org/10.1093/brain/awx047>
3. Kim SH, Ahn JH, Yang H, Lee P, Koh GY, Jeong Y (2020) Cerebral amyloid angiopathy aggravates perivascular clearance impairment in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol Commun* 8(1): 181. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01042-0>
4. Parodi-Rullán R, Ghiso J, Cabrera E, Rostagno A, Fossati S (2020) Alzheimer's amyloid β heterogeneous species differentially affect brain endothelial cell viability, blood-brain barrier integrity, and angiogenesis. *Aging Cell* 19(11): e13258. <https://doi.org/10.1111/accel.13258>
5. Jadcicola C (2017) The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 96(1): 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
6. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ (1977) The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1(5): 409–417. <https://doi.org/10.1002/ana.410010502>
7. Zille M, Ikhsan M, Jiang Y, Lampe J, Wenzel J, Schwaninger M (2019) The impact of endothelial cell death in the brain and its role after stroke: A systematic review. *Cell Stress* 3(11): 330–347. <https://doi.org/10.15698/cst2019.11.203>

8. Solesio ME, Peixoto PM, Debure L, Madamba SM, Leon MJ, Wisniewski T, Pavlov EV, Fossati S (2018) Carbonic anhydrase inhibition selectively prevents amyloid β neurovascular mitochondrial toxicity. *Aging Cell* 17(4): e12787.
<https://doi.org/10.1111/acel.12787>
9. Doll DN, Hu XH, Sun J, Lewis SE, Simpkins JW, Ren X (2015) Mitochondrial crisis in cerebrovascular endothelial cells opens the blood–brain barrier. *Stroke* 46(6): 1681–1689.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009099>
10. Aliev G, Smith MA, Torre JC, Perry G (2004) Mitochondria as a primary target for vascular hypoperfusion and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Mitochondrion* 4(5–6): 649–463.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.018>
11. Baliotti M, Giorgetti B, Casoli T, Solazzi M, Tamagnini F, Burattini C, Aicardi G, Fattoretti P (2013) Early selective vulnerability of synapses and synaptic mitochondria in the hippocampal CA1 region of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 34: 887–896.
<https://doi.org/10.3233/JAD-121711>
12. Du H, Guo L, Yan S, Sosunov AA, McKhann GM, Yan SS (2010) Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18670–18675.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1006586107>
13. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 14670–14675.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903563106>
14. Swerdlow RH, Khan SM (2004) A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 63(1): 8–20.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2003.12.045>
15. Solé M, Miñano-Molina AJ, Unzeta M (2015) Cross-talk between A β and endothelial SSAO/VAP-1 accelerates vascular damage and A β aggregation related to CAA-AD. *Neurobiol Aging* 36(2): 762–775.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.030>
16. Magistretti PJ, Allaman I (2018) Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci* 19: 235–249.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19>
17. Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, Jang C, Teng X, Lu W, Esparza LA, Reya T, Zhan L, Guo JY (2017) Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature* 551: 115–118.
<https://doi.org/10.1038/nature24057>
18. Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR (1997) Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): E207–E213.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.1.E207>
19. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Canceda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres B, Wu JQ (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34(36): 11929–11947.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
20. Хилажева ЕД, Писарева НВ, Моргунов АВ, Бойцова ЕБ, Таранушенко ТЕ, Фролова ОВ, Салмина АБ (2017) Активация лактатных рецепторов GPR81 стимулирует митохондриальный биогенез в клетках эндотелия церебральных микрососудов. *Анналы клинической экспериментальной неврологии* 11(1): 34–39. [Khilazheva ED, Pisareva NV, Morgun AV, Boytsova EB, Taranushenko TE, Frolova OV, Salmina AB (2017) Activation of lactate receptors GPR81 stimulates mitochondrial biogenesis in endothelial cells of cerebral microvessels. *Ann Clin Exper Neurol* 11(1): 34–39. (In Russ)].
21. Parodi-Rullán R, Sone JY, Fossat S (2019) Endothelial Mitochondrial Dysfunction in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 72(4): 1019–1039.
<https://doi.org/10.3233/JAD-190357>
22. Liu JP, Song M, Horton RM, Hu Y (2013) Reducing spread in climate model projections of a September ice-free Arctic. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 12571–12576.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1219716110>
23. Morgen K, Frölich L (2015) The metabolism hypothesis of Alzheimer's disease: from the concept of central insulin resistance and associated consequences to insulin therapy. *J Neural Transm* 122(4): 499–504.
<https://doi.org/10.1007/s00702-015-1377-5>
24. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(34): 14670–14675.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903563106>
25. Dragicevic N, Mamcarz M, Zhu Y, Buzzeo R, Tan J, Arendash GW, Bradshaw PC (2010) Mitochondrial amyloid-beta levels are associated with the extent of mitochondrial dysfunction in different brain regions and the degree of cognitive impairment in Alzheimer's transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S535–S550.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100342>

26. *Hartl D, Schuldt V, Forler S, Zabel C, Klose J, Rohe MJ* (2012) Presymptomatic alterations in energy metabolism and oxidative stress in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Proteom Res* 11(6): 3295–3304.
<https://doi.org/10.1021/pr300021e>
27. *Gan X, Huang S, Wu L, Wang Y, Hu G, Li G, Zhang H, Yu H, Swerdlow RH, Chen JX, Yan SS* (2014) Inhibition of ERK-DLP1 signaling and mitochondrial division alleviates mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease cybrid cell. *Biochim Biophys Acta* 1842(2): 220–231.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.009>
28. *Vlassenko AG, Vaishnavi SN, Couture L, Sacco D, Shannon BJ, Mach RH, Morris JC, Raichle ME, Mintun MA* (2010) Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(41): 17763–17767.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1010461107>
29. *Vlassenko AG, Gordon BA, Goyal MS, Su Y, Blazey TM, Durbin TJ, Couture LE, Christensen JJ, Jafri H, Morris JC, Raichle ME, Benzinger TL* (2018) Aerobic glycolysis and tau deposition in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 67: 95–98.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.03.014>
30. *Newington JT, Rappon T, Albers S, Wong DY, Rylett RJ, Cumming RC* (2012) Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid β and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 287(44): 37245–37258.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.366195>
31. *Garcia-Heredia JM, Carnero A* (2015) Decoding Warburg's hypothesis: tumor-related mutations in the mitochondrial respiratory chain. *Oncotarget* 6(39): 41582–41599.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.6057>
32. *Kim J, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV* (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3(3): 177–185.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>
33. *Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A* (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271(51): 32529–32537.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32529>
34. *Zilberter M, Ivanov A, Ziyatdinova S, Mukhtarov M, Malkov A, Alpár A, Tortoriello G, Botting CH, Fülöp L, Osypov AA, Pitkänen A, Tanila H, Harkany T, Zilberter Y* (2013) Dietary energy substrates reverse early neuronal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 125(1): 157–171.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12127>
35. *Morland C, Lauritzen KH, Puchades M, Holm-Hansen S, Andersson K, Gjedde A, Attramadal H, Storm-Mathisen J, Hildegard Bergersen L* (2015) The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain. *J Neurosci Res* 93(7): 1045–1055.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23593>
36. *Lauritzen KH, Morland C, Puchades M, Holm-Hansen S, Hagelin EM, Lauritzen F, Attramadal H, Storm-Mathisen J, Gjedde A, Bergersen LH* (2014) Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cereb Cortex* 24(10): 2784–2795.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bht136>
37. *Vardjan N, Chowdhury HH, Horvat A, Velebit J, Malnar M, Muhić M, Kreft M, Krivec ŠG, Bobnar ST, Miš K, Pirkmajer S, Offermanns S, Henriksen G, Storm-Mathisen J, Bergersen LH, Zorec R* (2018) Enhancement of Astroglial Aerobic Glycolysis by Extracellular Lactate-Mediated Increase in cAMP. *Front Mol Neurosci* 11: 148.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00148>
38. *Бойцова ЕБ, Мореун АВ, Мартынова ГП, Тохидпур А, Писарева НВ, Рузаева ВА, Салмина АБ* (2016) GPR81 рецепторы лактата в регуляции функциональной активности клеток. *Сибирск мед обзор* 5: 17–27. [*Boyisova EB, Morgun AV, Martynova GP, Tohidpur A, Pisareva NV, Ruzaeva VA, Salmina AB* (2016) GPR81 lactate receptors in the regulation of cell functional activity. *Siberian Med Rev* 5: 17–27. (In Russ)].
39. *Amer YO, Hebert-Chatelain E* (2018) Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859(9): 868–877.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.04.005>
40. *Dixit S, Fessel JP, Harrison FE* (2017) Mitochondrial dysfunction in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease and a novel protective role for ascorbate. *Free Radic Biol Med* 112: 515–523.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.021>
41. *Iijima-Ando K, Hearn SA, Shenton C, Gatt A, Zhao L, Iijima K* (2009) Mitochondrial mislocalization underlies Abeta42-induced neuronal dysfunction in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 4(12): e8310.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008310>

42. Canepa E, Domenicotti C, Marengo B, Passalacqua M, Marinari UM, Pronzato MA, Fedele E, Ricciarelli R (2013) Cyclic adenosine monophosphate as an endogenous modulator of the amyloid- β precursor protein metabolism. *IUBMB Life* 65(2): 127–133.
<https://doi.org/10.1002/iub.1109>
43. Terasaki T, Takakuwa S, Moritani S, Tsuji A (1991) Transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier: studies with monolayers of primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 258(3): 932–937.
44. An Y, Varma VR, Varma S, Casanova R, Dammer E, Pletnikova O, Chia CW, Egan JM, Ferrucci L, Troncoso J, Levey AI, Lah J, Seyfried NT, Legido-Quigley C, O'Brien R, Thambisetty M (2018) Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14(3): 318–329.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.09.011>
45. Lu W, Huang J, Sun S, Huang S, Gan S, Xu J, Yang M, Xu S, Jiang X (2015) Changes in lactate content and monocarboxylate transporter 2 expression in A β_{25-35} -treated rat model of Alzheimer's disease. *Neurol Sci* 36(6): 871–876.
<https://doi.org/10.1007/s10072-015-2087-3>
46. Hashimoto T, Hussien R, Cho HS, Kaufer D, Brooks GA (2008) Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. *PLoS One* 3(8): e2915.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002915>
47. Tescaroll F, Covolan L, Pellerin L (2014) Glutamate reduces glucose utilization while concomitantly enhancing AQP9 and MCT2 expression in cultured rat hippocampal neurons. *Front Neurosci* 8: 246.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00246>
48. Hashimoto T, Brooks GA (2008) Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med Sci Sports Exerc* 40(3): 486–494.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31815fcb04>
49. Nedergaar M, Goldman SA (1993) Carrier-mediated transport of lactic acid in cultured neurons and astrocytes. *Am J Phys* 265: R282–R289.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.2.R282>
50. Diemel GA (2012) Brain lactate metabolism: the discoveries and the controversies. *J Cereb Blood Flow Metab* 32: 1107–1138.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.175>
51. Yu X, Zhang R, Wei C, Gao Y, Yu Y, Wang L, Jiang J, Zhang X, Li J, Chen X (2021) MCT2 overexpression promotes recovery of cognitive function by increasing mitochondrial biogenesis in a rat model of stroke. *Anim Cells Syst (Seoul)* 25(2): 93–101.
<https://doi.org/10.1080/19768354.2021.1915379>

Influence of Lactate on Mitochondrial Activity in Endothelial Cells in Experimental *in vitro* with Acute Toxic Effect of Beta-Amyloid

**Ya. V. Gorina^a, E. D. Khilazheva^a, A. I. Mosyagina^a, E. V. Kharitonova^{a, *},
M. R. Kapkaeva^b, E. V. Stelmashuk^b, N. K. Isaev^b, N. A. Rozanova^b, and A. B. Salmina^b**

^a*Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia*

^b*Scientific Center of Neurology, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: kharitonova1988@mail.ru*

It has been established that during the development of Alzheimer's disease *in vitro*, the presence of lactate in the extracellular space in a dose-dependent manner reduces the activity of mitochondria in endothelial cells, blockade of lactate MCT transporters has the same effect, but stimulation of lactate GPR81 receptors on these cells causes an increase in mitochondrial activity. This suggests that a high concentration of lactate in the extracellular space suppresses the activity of mitochondria in endothelial cells, but this is not associated with the activity of GPR81 receptors. Most likely, the effects of GPR81 are realized in the presence of lower concentrations of extracellular lactate. Since the development of Alzheimer's disease is accompanied by a decrease in the expression of MCT isoforms that determine the transport and metabolism of lactate in nerve cells, in combination with our data, this indicates that a decrease in the expression of MCT transporters in Alzheimer's disease contributes to the development of mitochondrial dysfunction, and reproduction of the effects of extracellular lactate by activation of GPR81 receptors partially compensates for this impairment.

Keywords: Alzheimer's disease, cerebral endothelium, mitochondrial activity, phloretin

**РАСЧЕТНЫЙ ИНДЕКС НА ОСНОВЕ УРОВНЕЙ АКТИВНОСТИ ИЗОФОРМ
БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ДИАГНОЗА
МЯГКОГО КОГНИТИВНОГО СНИЖЕНИЯ**

© 2022 г. Д. И. Козлова^{1, *}, В. В. Хижа¹, Л. В. Аносова², А. А. Королькова³,
Д. С. Васильев¹, А. В. Рыбаков⁴, К. В. Пахомов¹, А. Б. Шишкин⁵,
С. В. Сумина⁵, М. Ф. Баллюзек³

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

²*Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия*

³*Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ России,
Санкт-Петербург, Россия*

⁴*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

⁵*Санкт-Петербургская клиническая больница РАН, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: di.kozlova.official@gmail.com*

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 29.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

В существующей клинической практике диагноз мягкого когнитивного снижения ставится на основе опроса пациента по мини-тесту оценки психического состояния (Mini-Mental State Examination – MMSE) и шкале оценки болезни Альцгеймера (The Alzheimer’s Disease Assessment Scale – Cognitive Subscale – ADAS-cog), которые обладают высокой степенью субъективизма и не дают полноценного представления о состоянии здоровья пациента. Нами проведена оценка эффективности использования диагностического индекса на основе активности холинэстераз плазмы крови для подтверждения или опровержения диагноза мягкого когнитивного снижения амнестического типа. В исследовании приняли участие 69 человек: 36 пациентов с диагнозом мягкого когнитивного снижения амнестического типа (а-МКС) и 33 здоровых добровольца. Диагноз а-МКС ставили при наборе менее 28 баллов по MMSE и более 2 баллов по ADAS-cog. В стационаре производили забор крови и выделение плазмы у пациентов обеих групп. На полученном биоматериале определяли активность форм бутирилхолинэстеразы с использованием метода Элмана в сочетании с ингибиторным анализом. Полученные данные активности атипичной и минорных форм использовали для расчета индекса, отражающего факт наличия или отсутствия у пациента диагноза а-МКС. Были определены диагностические интервалы, характерные для пациентов с а-МКС и здоровых добровольцев. Сравнение распределения показателей расчетного индекса по категориям диагноза осуществляли с помощью критерия χ -квадрат с поправкой Йейтса в пакете статистических программ SPSS 22. Результаты исследования показали, что диагностика на основе индекса соотношения активности атипичной и минорной изоформ по чувствительности и специфичности не уступает стандартным диагностическим шкалам, одновременно является перспективным, малоинвазивным, быстрым и бюджетным способом лабораторного подтверждения диагноза а-МКС. Предлагаемый в данной статье расчетный диагностический индекс основан на данных лабораторного исследо-

вания активности атипичной и минорных изоформ бутирилхолинэстеразы плазмы крови пациентов с предварительным диагнозом а-МКС, что впервые дает возможность подтвердить диагноз лабораторным методом, избегая субъективности.

Ключевые слова: мягкое когнитивное снижение, биомаркер, бутирилхолинэстераза, плазма крови, изоформы, расчетный индекс

DOI: 10.31857/S086981392206005X

Характерной чертой современного общества большинства стран мира является старение населения. В связи с этим заболевания, связанные с возрастом, приобретают все большее значение для здравоохранения и общества в целом. Расстройства познавательных функций, в частности, синдром мягкого когнитивного снижения амнестического типа (а-МКС), являются наиболее распространенной причиной старческой деменции. а-МКС представляет собой начальную стадию развития когнитивного дефицита по пути формирования такого нейродегенеративного заболевания, как болезнь Альцгеймера (БА). Постановка диагноза а-МКС пациентам производится на основании оценки их когнитивных функций в соответствии с диагностическими критериями синдрома МКС [1] по шкале общего ухудшения когнитивных функций (Global Deterioration Scale – GDS [2]) и мини-тесту оценки психического состояния (Mini-Mental State Examination – MMSE [1]). Однако на ранних стадиях заболевания данные индексы и шкалы обладают низкой чувствительностью и специфичностью, а также большой долей субъективизма, что не всегда позволяет своевременно поставить диагноз. Результатом является отсроченное применение необходимых лекарственных препаратов, что снижает их эффективность и приводит к необходимости применения более тяжелых и токсичных препаратов.

Таким образом, информативность традиционных критериев оценки наличия а-МКС недостаточна. Это делает актуальным поиск и внедрение в клиническую практику новых методов, в частности, лабораторной диагностики, дополняющих клинические шкалы и позволяющих своевременно диагностировать заболевание и корректировать ход лечения, ориентируясь на лабораторные показатели плазмы крови. В качестве таких перспективных биомаркеров нами в данной статье рассмотрена активность форм бутирилхолинэстеразы (БХЭ) плазмы крови.

Известно, что при постепенном развитии а-МКС происходит постоянно усиливающийся распад памяти и других когнитивных функций, который в терминальной стадии приобретает катастрофические масштабы [3]. Нарушение функционирования холинэргической системы мозга характерно для БА, что также сопровождается изменениями функционирования холинэстераз в периферической крови [4–8]. В процессе развития БА активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в мозге снижается, тогда как активность БХЭ возрастает. Параллельно показано, что общая удельная активность данного фермента значительно снижена в плазме крови как в контрольной группе пожилых людей, так и при БА [9]. В проведенных нами ранее исследованиях было показано, что общая активность БХЭ плазмы крови пациентов с диагнозом а-МКС ниже активности данного фермента плазмы крови пациентов контрольной группы на 17%, а при БА – на 38% процентов [10].

БХЭ содержится в различных тканях млекопитающих: в печени, сердце, эндотелии сосудов, нервной системе и плазме крови. Характерной особенностью данного фермента является отсутствие субстратного торможения. Генетические варианты этого фермента обладают различной чувствительностью ко многим обратимым и необратимым ингибиторам [11–19]. В популяции преобладает типичная форма БХЭ (т-БХЭ), а активность всех остальных семидесяти генетических вариантов либо ниже, либо отсутствует полностью (S-вариант). Показано, что у пациентов, несущих один из минорных генетических вариантов БХЭ в позднем возрасте в 2 раза

увеличен риск заболевания БА [20]. Нами были выбраны следующие формы фермента, как наиболее перспективные с позиции оценки вклада в изменение общей активности: типичная (т-БХЭ), атипичная (а-БХЭ) и минорные (ми-БХЭ). Предпочтение типичной форме БХЭ было отдано потому, что она является преобладающей формой фермента, атипичная форма выбрана, поскольку также часто встречается в популяции и у некоторых людей может выступать в качестве основной формы БХЭ, что приводит к высокой чувствительности таких людей к анестетикам и миорелаксантам. Минорные формы в данной статье – это совокупность остальных вариантов БХЭ, поскольку в настоящее время отсутствует возможность разделить их по критерию активности. Выбранные изоформы БХЭ имеют разную чувствительность к ингибиторам (сукцинилхолин, хлорид суксаметония, тизанидин, этпропазин и т.д.), что позволяет определить отдельно активность т- и а-БХЭ, а также суммарную активность ми-БХЭ.

Целью данного исследования явилась оценка эффективности использования диагностического индекса на основе активности БХЭ плазмы крови для подтверждения или опровержения диагноза мягкого когнитивного снижения амнестического типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами были обследованы 69 человек: 36 пациентов с диагнозом а-МКС (основная группа) и 33 пациента без нарушений внимания и памяти, составивших группу контроля (КГ). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Протокол исследования получил одобрение независимого этического комитета ФГБУЗ Санкт-Петербургской клинической больницы Российской академии наук (протокол № 240а от 20.01.2020 г.). Всеми пациентами было подписано добровольное информированное согласие на участие в данном исследовании.

Критериями включения пациентов в исследование было соответствие следующим диагностическим критериям синдрома МКС [1]: 1) наличие жалоб на снижение памяти и объективно выявляемые признаки легкого когнитивного снижения по результатам тестов; 2) оценка в диапазоне от 26 до 30 баллов по мини-тесту оценки психического состояния (Mini-MentalStateExamination – MMSE [1]); 3) повышение показателя до 2 баллов по шкале оценки болезни Альцгеймера (ADAS-cog) [21]. В данное исследование включались только пациенты с МКС амнестического типа. Критериями невключения в обеих группах являлись: отказ пациента от участия в исследовании; наличие любой активной инфекции в период включения в исследование; наличие онкологических заболеваний в период включения в исследование; наличие аутоиммунных заболеваний; наличие хронических неинфекционных заболеваний в стадии декомпенсации; наличие мягкого когнитивного снижения сосудистого типа.

Забор крови у пациентов для анализа активности ферментов проводили в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (Li-гепарин). Полученные образцы крови центрифугировали при 2000 g в течение 15 мин, а затем надосадочную жидкость (плазму) повторно центрифугировали при 9000 g 20 мин.

Определение активности изоформ БХЭ плазмы крови осуществляли по методу Элмана [22] в комбинации с ингибиторным анализом [23] в 96-луночных планшетах в присутствии синтетического субстрата бутирилтиохолина (БТХ, 100 мМ; “Sigma”, Великобритания) и ингибиторов (хлорида суксаметония, тизанидина и этпропазина). Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотомет-

ре (Immuno Chem-2100, Microplate Reader, США) при длине волны 405 нм. Полученные с прибора данные оптической плотности использовали для расчета удельной активности фермента (нмоль БТХ/мг белка \times мин). Количество белка в пробе нормировалось по методу Бредфорда [24]. Метод Элмана без применения ингибиторов позволяет определять общую удельную активность БХЭ, тогда как применение различных ингибиторов (суксаметония хлорида, тизанидина и этопропазина) дает возможность отделить активности типичной и атипичной форм от суммарной удельной активности минорных форм. На основании соотношения активности атипичной и минорной форм БХЭ рассчитывали индекс и проводили определение диагностических интервалов на основании предварительных анализов показателей контрольной группы ($n = 36$). Контрольные значения сопоставляли с данными, полученными ранее и использованными для написания патента № 033 501 “Способ дифференциальной диагностики ранней или выраженной стадии ревматоидного артрита с остеоартритом”, в котором была проанализирована активность форм БХЭ у пациентов с диагнозом ревматоидного артрита (РА) и контрольной группы здоровых доноров [23]. Данные пациентов контрольной группы позволили определить границы диагностических интервалов нормы, применяемые в данном исследовании.

Статистическая обработка данных

Расчет оптимального размера выборок проводился на основе заранее проведенного пилотного эксперимента с использованием программы К.М. Sullivan (<http://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>). Сравнение распределения пациентов по категориям диагноза осуществляли с помощью критерия χ -квадрат с поправкой Йейтса в пакете статистических программ SPSS 22. Для каждого из 3 критериев (соотношение активностей а-БХЭ/ми-БХЭ vs ADAS vs MMSE) определяли специфичность и чувствительность метода. Специфичность определялась как доля истинно отрицательных случаев, выраженная в процентах от общего количества отрицательных диагнозов, а чувствительность – как доля истинно положительных случаев, выраженная в процентах от общего количества положительных диагнозов МКС.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст пациентов с диагнозом а-МКС составил 56 ± 21 год, 12 мужчин и 24 женщины; группа контроля включала 18 мужчин и 15 женщин в возрасте $51 \pm \pm 23$ года. Демографические характеристики групп статистически значимо не различались.

В группе пациентов с а-МКС медиана длительности заболевания составила 7 (1; 10) лет. Пациенты из группы а-МКС имели незначительные, но статистически достоверные изменения когнитивных функций по сравнению с контролем, которые выражались в снижении по шкале MMSE до 28.15 ± 0.82 балла и повышении показателя ADAS-cog до 2 баллов (табл. 1).

С помощью диагностических критериев ADAS и MMSE клиницистами было поставлено 33 диагноза “здоров” (КГ) и 36 диагнозов “а-МКС”.

В ходе лабораторного исследования плазмы крови по определению удельной активности разных форм БХЭ показано, что у пациентов обеих обследованных групп наибольшую активность имеет т-БХЭ, тогда как активность а-БХЭ и ми-БХЭ ниже в среднем на 63 и 58% соответственно. При этом у пациентов с диагнозом а-МКС активность всех исследованных изоформ фермента достоверно ниже относительно контрольной группы условно здоровых доноров (рис. 1).

Двухфакторный анализ полученных данных показал, что различия средних значений активности разных форм БХЭ у пациентов с а-МКС и контрольной группы

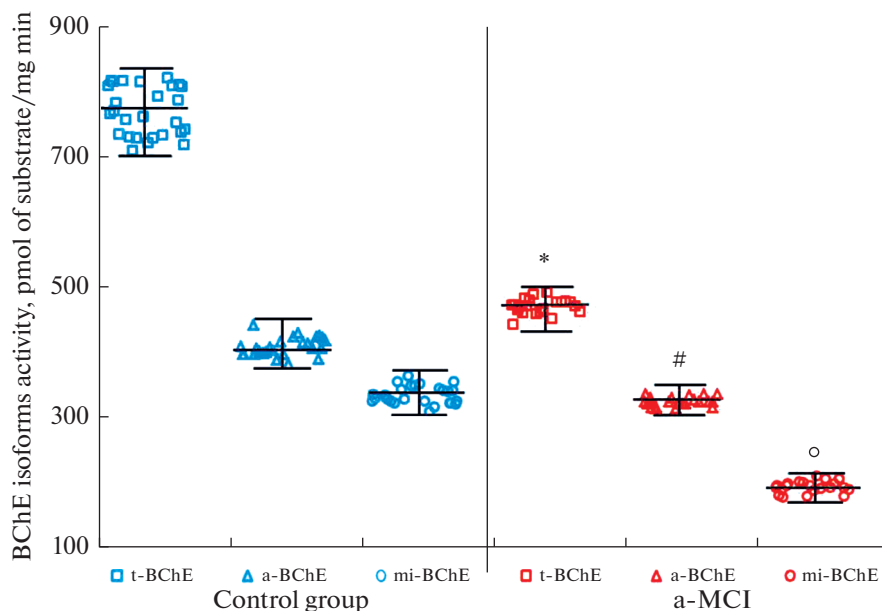


Рис. 1. Удельная активность изоформ БХЭ (VChE) в плазме крови пациентов с диагнозом а-МКС и пациентов без нарушения внимания и памяти (КГ). * – обозначены статистически значимые различия удельной активности т-БХЭ (t-BChE) между КГ и а-МКС, # – обозначены статистически значимые различия удельной активности а-БХЭ (a-BChE) между КГ и а-МКС; ° – обозначены статистически значимые различия удельной активности ми-БХЭ (mi-BChE) между КГ и а-МКС ($p \leq 0.001$).

больше, чем можно было бы ожидать случайно, и при статистически значимой разнице ($p \leq 0.001$).

Более того, выявлено, что у пациентов с диагнозом а-МКС на фоне снижения активности БХЭ меняется и вклад ее изоформ в общую активность. Так, на фоне снижения показателей удельной активности изоформ БХЭ, вклад активности атипичной формы возрастает (рис. 2).

В среднем по обеим группам пациентов удельная активность а- и ми-БХЭ ниже удельной активности т-БХЭ на 39 и 58% соответственно.

Использование показателей удельной активности изоформ БХЭ неудобно для целей клинической и лабораторной диагностики. В связи с этим была предпринята разработка расчетного коэффициента на основе соотношения активности наиболее информативных изоформ БХЭ и определение диагностических интервалов, которые обладают наибольшей предсказательной силой при постановке диагноза а-МКС.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Этап заболевания	Средний возраст, годы	MMSE, баллы	ADAS-cog, баллы
Контрольная группа ($n = 33$)			
–	51 ± 23	31.05 ± 0.01	1.00 ± 0.00
Мягкое когнитивное снижение амнестического типа ($n = 36$)			
Додементный	56 ± 21	28.15 ± 0.82	$2.00 \pm 0.00^*$

* Статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

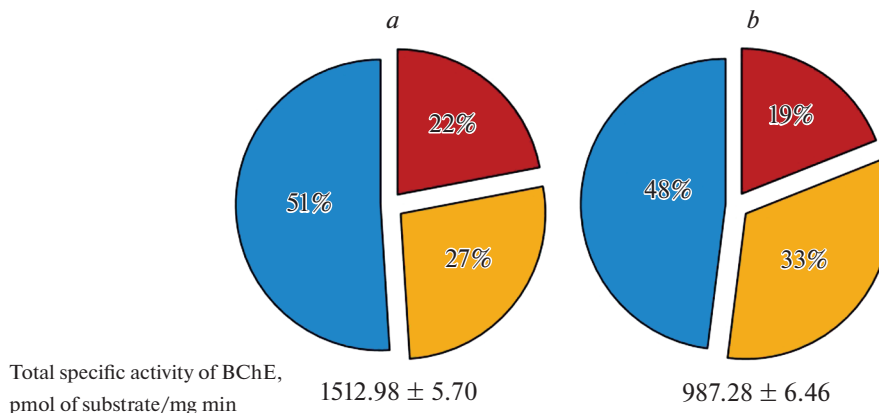


Рис. 2. Вклад активности типичной (τ -БХЭ, голубой сектор), атипичной (α -БХЭ, желтый сектор) и минорных форм (ми-БХЭ, красный сектор) в общую активность БХЭ плазмы крови. *a* – пациенты без нарушений внимания и памяти. *b* – пациенты с диагнозом а-МКС. Данные представлены в % от общей активности. Различия вклада удельной активности каждой формы БХЭ между КГ и а-МКС статистически значимы ($p \leq 0.001$).

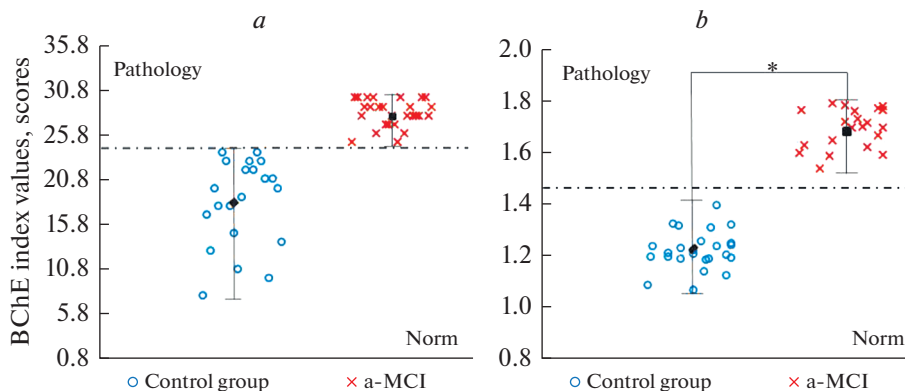


Рис. 3. Сравнение диаграмм, полученных на основе тестирования исследуемых групп пациентов по шкале MMSE и с использованием разработанного диагностического индекса. *a* – разброс показателей в исследуемых группах по шкале MMSE; *b* – разброс показателей по индексу на основе расчета отношения активности α -БХЭ (α -ВChE) и ми-БХЭ (mi-ВChE). Данные представлены как $Me \pm SEM$. * – статистически значимые различия между группой контроля и пациентами с диагнозом а-МКС при $p < 0.0001$.

В результате проведенного анализа было показано, что наибольшую предсказательную силу имеет отношение активности атипичной формы БХЭ к ее минорным формам. В соответствии с выбранным подходом диагностический интервал группы условно здоровых доноров находится в пределах от 0 до 1.5, тогда как для а-МКС от 1.6 до 2.5.

По специфичности предложенная нами лабораторная диагностика на основе диагностического индекса на 94.6% соответствует существующим критериям ADAS и MSSE и в настоящий момент не имеет аналогов в мировой практике.

Таблица 2. Распределение пациентов по категориям диагноза

Диагноз	Истинно- позитивных	Истинно- негативных	Ложно- позитивных	Ложно- негативных	Чувствитель- ность, %	Специфич- ность, %
ADAS	36	33	0	0	—	—
MSSE	36	33	0	0	—	—
Индекс а- БХЭ/ми-БХЭ	30	33	0	6	84.6	100

Число степеней свободы равно 3; связь между факторным и результативным признаками статистически незначима, уровень значимости $p > 0.05$.

В ходе проведенного исследования абсолютно все случаи позитивного диагноза а-МКС на основе анализа БХЭ плазмы крови подтвердились результатами диагностики по ADAS и/или MSSE, при этом случаи постановки ложно позитивного диагноза отсутствовали. Это позволяет сделать вывод, что предлагаемая методика обладает достаточно высокой специфичностью к обнаружению а-МКС (табл. 2).

На основе полученных данных можно сделать заключение, что предложенная нами диагностика с использованием ингибиторного анализа активности разных форм БХЭ плазмы крови диагностирует только доподлинно больных и пригодна для использования в тех случаях, когда лечение больного связано с серьезными побочными эффектами и гипердиагностика пациентов нежелательна. Более того, этот показатель может быть информативным и для ранней оценки развития а-МКС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из литературных данных известно, что основная функциональная роль в работе холинэргической системы мозга принадлежит АХЭ, тогда как функцией БХЭ является дублирование роли АХЭ в условиях функциональной недостаточности последней [25]. АХЭ в головном мозге экспрессируется как в холинэргических нейронах, так и в тех, где отсутствуют какие-либо маркеры холинэргической нейротрансмиссии [26, 27]. БХЭ локализуется главным образом в глиальных клетках, а в нейронах и эндотелиальных клетках капилляров ее концентрации минимальны. Многочисленные исследования посвящены изучению роли АХЭ в патогенезе БА в связи с тем, что она занимает главенствующее положение в головном мозге по сравнению с БХЭ. Однако в последнее десятилетие все больше внимания уделяется роли БХЭ в формировании патологических изменений характерных как для БА, так и для предполагаемой промежуточной стадии ее развития – а-МКС [28–32]. В частности, известно, что БХЭ влияет на развитие БА, но не сама по себе, а при наличии аполипопротеина E epsilon 4 (ApoEε4) [33]. Проведенные нами ранее исследования удельной активности данного фермента в плазме крови пациентов с диагнозами а-МКС, БА и контрольной группы доноров показали, что этот параметр позволяет дифференцировать оба состояния друг от друга и от пациентов без нарушения внимания и памяти [10]. Однако полученные предварительные данные не дали ответ на вопрос за счет снижения или изменения соотношения активности каких форм происходит уменьшение общей активности БХЭ. Кроме того, сам по себе показатель активности неудобен для применения в рамках клинической лабораторной диагностики, и его сложно включить в существующие диагностические шкалы. Данные факты послужили предпосылками проведения публикуемого в данной статье исследования, посвященного определению активности изоформ БХЭ и разработке расчетного индекса, основанного на их соотношении, в качестве возможной диагностической стратегии для лабораторного подтверждения диагноза а-МКС. Результаты проведенного исследования позволили продемонстриро-

вать, что у пациентов с а-МКС происходит статистически значимое снижение активности всех проанализированных изоформ БХЭ по сравнению с пациентами без выраженных нарушений внимания и памяти.

Сопоставительный анализ различных комбинаций соотношения т-, а- и ми-БХЭ показал, что наибольшую предсказательную силу для подтверждения диагноза а-МКС имеет отношение активности атипичной БХЭ к ее минорным формам.

Важно отметить, что предпочтение атипичной форме было отдано потому, что на фоне снижения удельной активности БХЭ при а-МКС ее вклад в общую активность возрастает, тогда как вклад типичной и минорной изоформ снижается. Это дало нам возможность предположить компенсаторную функцию а-БХЭ при снижении активности т-БХЭ на фоне развития когнитивного дефицита. Минорные формы БХЭ были выбраны, поскольку при применении лекарственных препаратов для купирования симптомов развивающегося а-МКС угнетается активность как типичной, так и, в меньшей степени, атипичной форм [29], тогда как сведений о подавлении активности минорных форм нет.

Диапазон полученного на основе соотношения активностей двух выбранных изоформ диагностического индекса для контрольной группы пациентов составил от 0 до 1.5, тогда как для группы пациентов с диагнозом а-МКС – от 1.6 до 2.5, что позволило различить пациентов этих двух групп. В 94.6% случаев постановки диагноза а-МКС по расчетному индексу на основе БХЭ совпадали с диагнозами, поставленными по ADAS и MSSE. В отличие от диагностических шкал когнитивной функции, данный индекс основан на лабораторных показателях активности изоформ БХЭ плазмы крови пациентов и позволяет быстро проводить скрининговые обследования широких групп населения с целью выявления а-МКС даже до проведения тестирования с использованием шкал на приеме у профильного специалиста.

Диагностический индекс на основе соотношения активности атипичной и минорных изоформ БХЭ плазмы крови позволяет достаточно точно подтверждать наличие а-МКС. Результаты исследования представляют большой практический интерес для внедрения в клиническую лабораторную диагностику. Разработанная на основе данного исследования диагностическая тест-система обладает небольшой себестоимостью в производстве, при этом позволяет производить одновременное тестирование образцов, полученных от 32 пациентов. Для проведения исследования требуется небольшой объем крови (1 мл), что имеет большое значение при работе с пациентами, находящимися на стационарном обследовании, постоянно проходящими процедуру забора больших объемов крови на различные исследования.

Предлагаемый диагностический индекс является единственным в своем роде лабораторным критерием подтверждения диагноза а-МКС, обладающим высокой чувствительностью и специфичностью. Он не заменяет собой имеющиеся диагностические шкалы, а лишь дополняет их, позволяя с большей уверенностью устанавливать диагноз и наиболее эффективно подбирать лечение.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Часть лабораторных исследований выполнена в рамках государственного задания 075-00408-21-00. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Д.И.К., Д.С.В., М.Ф.Б., А.Б.Ш.), обследование пациентов исследуемых групп (А.Б.Ш., С.В.С., Л.В.А., А.А.К.), сбор биологического материала пациентов, включенных в исследование (А.Б.Ш., С.В.С., Л.В.А., А.А.К.), определение активности изоформ исследуемого фермента в плазме крови пациентов исследуемых групп (Д.И.К., В.В.Х., А.В.Р., К.В.П.), обработка данных (Д.И.К., Д.С.В., В.В.Х.), написание и редактирование манускрипта (Д.И.К., Д.С.В., В.В.Х.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Folstein M, Folstein S, McHugh P* (1975) Mini-Mental State. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 2: 189–198. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6)
2. *Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T* (1982) The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 139(9): 1136–1139. <https://doi.org/10.1176/ajp.139.9.1136>
3. *Cloutier S, Chertkow H, Kergoat MJ, Gauthier S, Belleville S* (2015) Patterns of Cognitive Decline Prior to Dementia in Persons with Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimer's Dis* 47(4): 901–913. <https://doi.org/10.3233/JAD-142910>
4. *Johansson P, Almqvist EG, Johansson JO, Mattsson N, Andreasson U, Hansson O, Wallin A, Blennow K, Zetterberg H, Svensson J* (2013) Cerebrospinal Fluid (CSF) 25-Hydroxyvitamin D Concentration and CSF Acetylcholinesterase Activity Are Reduced in Patients with Alzheimer's Disease. *PLoS One* 8(11): e81989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081989>
5. *Karami A, Darreh-Shori T, Schultzberg M, Eriksdotter M* (2021) CSF and Plasma Cholinergic Markers in Patients With Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci* 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.704583>
6. *Rinne J, Kaasinen V, Järvenpää T, Nägren K, Roivainen A, Yu M, Oikonen V, Kurki T* (2003) Brain acetylcholinesterase activity in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg & Psych* 74: 113–115. <https://doi.org/10.1136/jnnp.74.1.113>
7. *Schliebs R, Arendt T* (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221: 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
8. *Журавин ИА, Васильев ДС, Дубровская НМ, Козлова ДИ, Кочкина ЕГ, Плеснева СА, Туманова НЛ, Алексеева ОС, Ветов АН, Наливаева НН* (2014) Изучение механизмов когнитивных дисфункций с использованием модели пренатальной гипоксии. В кн.: Нейродегенеративные заболевания – от генома до целостного организма. Под ред МВУгрюмова. М. Научный мир. 419–437. [*Zhuravin IA, Vasilev DS, Dubrovskaya NM, Kozlova DI, Kochkina EG, Plesneva SA, Tumanova NL, Alekseeva OS, Vetosh AN, Nalivaeva NN* (2014) Measurement of cognitive dysfunctions using models of prenatal hypoxia. In: Neurodegenerative diseases – from the genome of a rich organism. Ed. MV Ugryumov. M. Scientific World Publishing House 419–437. (In Russ)].
9. *Josviak ND, Batistela MS, Souza RKM, Wegner NR, Bono GF, Sulzbach CD, Simão-Silva DP, Piovezan MR, Souza RLR, Furtado-Alle L* (2017) Plasma butyrylcholinesterase activity: a possible biomarker for differential diagnosis between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies? *Int J Neurosci* 127(12): 1082–1086. <https://doi.org/10.1080/00207454.2017.1329203>
10. *Журавин ИА, Наливаева НН, Козлова ДИ, Кочкина ЕГ, Федорова ЯБ, Гаврилова СИ* (2015) Активность холинэстераз и неприлизина плазмы крови как потенциальные биомаркеры синдрома мягкого когнитивного снижения и болезни Альцгеймера. *Журн неврол психиатр им СС Корсакова* 115(12): 110–117. [*Zhuravin IA, Nalivaeva NN, Kozlova DI, Kochkina EG, Fedorova YB, Gavrilova SI* (2015) The activity of blood serum cholinesterases and neprilysin as potential biomarkers of mild-cognitive impairment and alzheimer's disease. *Neurosci Behav Phys* 115(12): 110–117. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/jnevro2015115112110-117>
11. *Бресткин АП, Кузнецова ЛП, Моралев СН, Розенгарт ЕВ, Эпштейн ЛМ* (1997) Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток. ТИПРО-Центр. [*Brestkin AP, Kuznetsova LP, Moralev SN, Rosengart EV, Epshtein LM* (1997) Cholinesterases of terrestrial animals and hydrobionts. Vladivostok. TINRO-Center. (In Russ)].
12. *McGuire M, Nogueira C, Bartels C, Lightstone H, Hajra A, Van der Spek A, Lockridge O, La Du B* (1989) Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypi-

- cal) variant form of human serum cholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(3): 953–957.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.3.953>
13. *Nogueira C, Bartels C, McGuire M, Adkins S, Lubrano T, Rubinstein H, Lightstone H, Van der Spek A, Lockridge O, La Du B* (1992) Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am J Hum Genet* 51(4): 821–828.
 14. *Liddell J, Lehmann H, Silk E* (1962) A 'silent' pseudo-cholinesterase gene. *Nature* 193: 561–562.
<https://doi.org/10.1136/jmg.3.3.190>
 15. *Jensen F, Bartels C, La Du B* (1992) Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. *Pharmacogenetics* 2(5): 234–240.
<https://doi.org/10.1097/00008571-199210000-00006>
 16. *Garry P, Dietz A, Lubrano T, Ford P, James K, Rubinstein H* (1976) New allele at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 13(1): 38–42.
<https://doi.org/10.1136/jmg.13.1.38>
 17. *Rubinstein H, Dietz A, Lubrano T* (1978) E1k, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 15(1): 27–29.
<https://doi.org/10.1136/jmg.15.1.27>
 18. *Lehmann H, Liddell J* (1969) Human cholinesterase (pseudocholinesterase): genetic variants and their recognition. *Br J Anaesth* 41(3): 235–244.
<https://doi.org/10.1093/bja/41.3.235>
 19. *Podoly E, Shalev D, Shenhar-Tsarfaty S, Bennett E, Ben Assayag E, Wilgus H, Livnah O, Soreq H* (2009) The Butyrylcholinesterase K Variant Confers Structurally Derived Risks for Alzheimer Pathology. *J Biol Chem* 284(25): 17170–17179.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004952>
 20. *Wang Z, Jiang Y, Wang X, Du Y, Xiao D, Deng Y, Wang J* (2015) Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease risk: a meta-analysis. *Med Sci Monit* 16; 21: 1408–1413.
<https://doi.org/10.12659/MSM.892982>
 21. *Mohs RC* (1996) The Alzheimers Disease Assessment Scale (ADAS). *Int Psychogeriatrics* 8(2): 195–203.
<https://doi.org/10.1017/s1041610296002578>
 22. *Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Feather-Stone RM* (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(2): 88–90.
 23. *Васильев ДС, Козлова ДИ, Попов АВ* (2019) Способ дифференциальной диагностики ранней или выраженной стадии ревматоидного артрита с остеоартритом. Патент №1071064, РФ, МПК G01N 33/96 (2006.01) G01N 33/564 (2006.01). Заявл. 2018.04.03; Опубл. 2019.10.31; Бюл. № 10. [Vasilev DS, Kozlova DI, Popov AV (2019) Method for differential diagnosis of early or severe stages of rheumatoid arthritis with osteoarthritis. Patent No. 1071064, Russian Federation, IPC G01N 33/96 (2006.01) G01N 33/564 (2006.01). Appl. 2018.04.03; Published 2019.10.31; Bull. No. 10. (In Russ)].
 24. *Bradford MM* (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72(1–2): 248–254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
 25. *Darvesh S, Hopkins DA* (2003) Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol* 463 (1): 25–43.
<https://doi.org/10.1002/cne.10751>
 26. *Greenfield SA* (1991) A noncholinergic action of acetylcholinesterase (AChE) in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. *Cell Mol Neurobiol* 11(1): 55–77.
<https://doi.org/10.1007/BF00712800>
 27. *Appleyard M, Jahnsen H* (1992) Actions of acetylcholinesterase in the guinea-pig cerebellar cortex in vitro. *Neuroscience* 47(2): 291–301.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90245-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90245-w)
 28. *Arendt T, Bruckner MK, Lange M, Bigl V* (1992) Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms. *Neurochem Int* 21(3): 381–396.
[https://doi.org/10.1016/0197-0186\(92\)90189-x](https://doi.org/10.1016/0197-0186(92)90189-x)
 29. *Mesulam M, Geula C* (1994) Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann Neurol* 36: 722–727.
<https://doi.org/10.1002/ana.410360506>
 30. *Mueller B, Adler G* (2015) Prevalence of wild – type butyrylcholinesterase genotype in patients with Alzheimer's dementia. *World J Neurosci* 5: 175–179.
<https://doi.org/10.4236/wjns.2015.53019>
 31. *Mizukami K, Akatsu H, Abrahamson EE, Mi Z, Ikonovic MD* (2016) Immunohistochemical analysis of hippocampal butyrylcholinesterase: implications for regional vulnerability in Alzheimer's disease. *Neuropathology* 36: 135–145.
<https://doi.org/10.1111/ncup.12241>

32. Macdonald R, Maxwell SP, Reid GA, Cash MK, DeBay DR, Darvesh S (2017) Quantification of butyrylcholinesterase activity as a sensitive and specific biomarker of Alzheimer's disease. *J Alzh Dis* 58: 491–505.
<https://doi.org/10.3233/JAD-170164>
33. Gabriel AJ, Almeida MR, Ribeiro MH, Carneiro D, Valério D, Pinheiro AC, Pascoal R, Santana I, Baldeiras I (2018) Influence of butyrylcholinesterase in progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Alzh Dis* 61(3): 1097–1105.
<https://doi.org/10.3233/JAD-170695>

A New Diagnostic Index Based on the Activity of Butyrylcholinesterase Isoforms for Laboratory Confirmation of Mild Cognitive Impairment Diagnosis

**D. I. Kozlova^a, V. V. Khizha^a, L. V. Anosova^b, A. A. Korolkova^c, D. S. Vasilev^a,
A. V. Rybakov^d, K. V. Pakhomov^a, A. B. Shishkin^e, S. V. Sumina^e, and M. F. Ballyzek^e**

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry
of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b*St. Petersburg Research Institute of Ear, Throat, Nose and Speech Ministry of Health
of the Russian Federation St. Petersburg, Russia*

^c*Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,
St. Petersburg, Russia*

^d*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia*

^e*St. Petersburg Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: di.kozlova.official@gmail.com*

In current clinical practice the diagnosis of the amnesic-mild cognitive impairment (a-MCI) is made on the basis of a patient's mini-mental state examination (MMSE) and the Alzheimer's disease assessment scale cognitive subscale (ADAS-cog), which have a high degree of occurrence of subjective bias and do not give a complete picture of the patient's health status. We have evaluated the effectiveness of a diagnostic index based on the activity of blood plasma butyrylcholinesterases (BChE) to confirm or refute the a-MCI diagnosis. The study involved 69 people: 36 patients diagnosed with a-MCI and 33 healthy volunteers. The a-MCI was diagnosed when the score was less than 28 points on the MMSE and more than 2 points on ADAS-cog scales. Collection of blood and plasma separation from patients of both groups have been performed in a hospital setting. The activity of BChE forms was analysed by Ellman's method combined with inhibitor analysis. The data on the activity of the atypical and minor forms of BChE were used to calculate an index correlating with the a-MCI diagnosis. Diagnostic intervals characteristic of patients with a-MCI and healthy volunteers have been determined.

Keywords: mild cognitive impairment, biomarker, butyrylcholinesterases, blood plasma, isoforms, calculated index

ИЗМЕНЕНИЕ СКОРОСТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

© 2022 г. О. П. Горшкова*

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

**E-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

Поступила в редакцию 02.04.2022 г.

После доработки 03.05.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Старение сопровождается изменениями в структуре и функциональной активности церебральных сосудов, что может приводить к нарушению мозгового кровотока и повышенному риску развития нейродегенеративных процессов. В работе исследовали возрастные изменения скоростных показателей церебрального кровотока крыс методом ультразвуковой доплерографии. Проводили сравнительный анализ состояния кровотока коры и подкорковых структур полушарий головного мозга по величине линейных скоростей и индексов кровотока у крыс Спрег-Доули в возрасте 4 и 18 мес. Установлено, что к 18 мес. у крыс снижается уровень сопротивления сосудов головного мозга, на что указывает увеличение конечной диастолической скорости кровотока и уменьшение индекса пульсации. Одновременно наблюдается увеличение перфузии лобной и теменной областей полушарий головного мозга за счет повышения пиковых и средней за сердечный цикл скоростей кровотока, и происходит активация коллатеральных путей кровоснабжения, о чем свидетельствует снижение средней систолической скорости кровотока в лобной области полушарий. Эти изменения, вероятно, являются адаптивными проявлениями нарушения мозговой гемодинамики, направленными на поддержание адекватной перфузии ткани стареющего мозга.

Ключевые слова: скорость мозгового кровотока, ультразвуковая доплерография, старение

DOI: 10.31857/S0869813922060036

Церебральный кровоток обеспечивает поддержание структурно-функциональной целостности мозга, обеспечивая адекватную доставку питательных веществ и кислорода в любое время и в любой участок головного мозга, избегая как гипоперфузии, так и гиперперфузии. Нормальное старение сопровождается значительными изменениями в структуре и функциональной активности церебральных сосудов, что может приводить к нарушению мозгового кровотока и повышенному риску развития нейродегенеративных процессов и цереброваскулярных заболеваний [1–3]. Важными количественными показателями мозговой гемодинамики, которые коррелируют с метаболизмом мозга в состоянии покоя, являются давление крови, сопротивление сосудов и скорость кровотока [4]. Имеющиеся в литературе данные, полученные на людях и различных экспериментальных животных, противоречивы и свидетельствуют как о возрастном уменьшении мозгового кровотока [2, 5–7], так и об отсутствии изменений скоростей и объемов потоков в мозговых артериях при старении [6, 8, 9]. Различия могут быть связаны с методологическими

особенностями измерения скорости кровотока, видовыми или регионарными различиями и возрастом [8]. Целью данной работы было исследование возрастных изменений скоростных показателей церебрального кровотока у крыс методом ультразвуковой доплерографии. В задачи исследования входило проведение анализа состояния кровотока коры и подкорковых структур полушарий головного мозга по величине линейных скоростей и индексов кровотока у крыс линии Спрег-Доули в возрасте 4 и 18 мес.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс Спрег-Доули из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН” в возрасте 4 ($n = 12$, масса 380 ± 50 г) и 18 мес. ($n = 11$, масса 540 ± 80 г). Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и требованиям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. До проведения эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

При проведении эксперимента крысы наркотизировались зоветилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). Среднее артериальное давление (АД), измеренное с помощью прибора для неинвазивного измерения АД (“Систола”, Netrotobitics, Россия) в хвостовой артерии, у наркотизированных крыс в возрасте 4 мес. составляло 129 ± 7 мм рт. ст., в возрасте 18 мес. — 136 ± 5 мм рт. ст.

Скорость мозгового кровотока измерялась через высверленное в теменной области черепа отверстие ($S \approx 1 \text{ см}^2$) ультразвуковым компьютеризированным доплерографом ММ-Д-К (Minimax Doppler v.1.7, УЗДП-009-02, Россия) с рабочей частотой датчика 25 МГц. Датчик устанавливался на область измерения через проводящий гель без сдавливания поверхности измерения. Глубина прохождения ультразвукового сигнала для датчика данной частоты составляет порядка 3–4 мм, что обеспечивало исследование кровотока в коре и подкорковых структурах головного мозга крыс. Постановка датчика осуществлялась под углом не более 60 град., что соответствует наилучшему акустическому и визуальному доплеровскому сигналу. В основу метода доплерографии положена регистрация доплеровского сдвига частот, вызванного отражением ультразвукового сигнала от форменных элементов крови. Ультразвуковой доплерограф определяет направление движения и линейную скорость кровотока по срезу исследуемой ткани. Данные представляются на экране монитора в виде цветной доплерограммы. На основании полученной визуальной картины в режиме online можно анализировать все получаемые данные параметров кровотока и выбирать безартефактный фрагмент доплерограммы. По характерному звуковому сигналу и визуальному сигналу на мониторе прибора можно определить тип преобладающего кровотока. В наших исследованиях запись сигнала проводилась преимущественно с артериального участка сосудистой сети обоих полушарий головного мозга. Звуковой сигнал, получаемый с участка сосудистого русла преимущественно артериального наполнения, характеризуется пульсирующим тихим шумом, синхронизированным с фазами сердечного цикла; визуальный сигнал имеет в спектре систолические и диастолические пики.

Оценка состояния кровотока проводилась по данным спектрального анализа доплеровского сигнала. С помощью программного обеспечения доплерографа автоматически рассчитывались величины линейных скоростей кровотока (пико-

вой (V_{ps}) и средней систолической (V_s), конечной (V_d) и средней диастолической (V_{pd}) и средней за сердечный цикл (V_m). Также оценивались индексы кровотока: индекс пульсации (Гослинга), отражающий упруго-эластические свойства артерий (PI), индекс периферического сопротивления (Пурсело), отражающий состояние сопротивления кровотоку дистальнее места измерения (RI) и индекс Арбелли (STI), отражающий степень стеноза артерий [10, 11]:

$$PI = (V_{ps} - V_d)/V_m, \quad RI = (V_{ps} - V_d)/V_{ps}, \quad STI = 0.9(1 - V_d/V_s) \times 100\%.$$

Межполушарной асимметрии скоростей и индексов кровотока обнаружено не было.

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Проверка экспериментальных данных на нормальное распределение проводилась с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок при сравнении более 2 групп при нормальном характере распределения вариант в совокупности данных (выборке) проводилось при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке отличным от нормального при сравнении 2 групп использовался U-критерий Манна–Уитни. Если исследование на нормальность показывало его отсутствие хотя бы для одной выборки, статистический анализ полученных данных производился с использованием непараметрических методов. Данные в табл. 1 и на графиках представлены как медиана [25-й процентиль; 75-й процентиль]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У 18-месячных крыс по сравнению с более молодыми животными было отмечено увеличение пиковых скоростей кровотока: систолической (в среднем на 33.81%, $p = 0.01$, $U = 700$, критерий Манна–Уитни) и конечной диастолической (в среднем в 2 раза, $p = 0.02$, $U = 532$, критерий Манна–Уитни, табл. 1). Средняя за сердечный цикл скорость кровотока также была увеличена (в среднем на 70.72%, $p = 0.02$, $U = 707$, критерий Манна–Уитни, табл. 1).

Анализ скоростных параметров кровотока в различных участках полушарий головного мозга показал, что возрастные изменения наблюдаются только в лобной и теменной области полушарий. При старении в лобной области увеличивается пиковая систолическая (до 43.53 [21.89; 54.83] см/с по сравнению с 30.19 [19.34; 39.94] см/с у 4-месячных крыс), средняя за сердечный цикл (в среднем в 2 раза, $p = 0.05$, $U = 612$, критерий Манна–Уитни) и конечная диастолическая (до 2.67 [1.18; 5.66] см/с по сравнению с 1.61 [0.69; 2.62] см/с у крыс в возрасте 4 мес.) скорости кровотока (рис. 1). Показатели средней систолической скорости кровотока снижаются (0.53 [0.38;

Таблица 1. Параметры мозгового кровотока у крыс разного возраста

Линейная скорость кровотока, см/с	Крысы в возрасте 4 мес. ($n = 12$)	Крысы в возрасте 18 мес. ($n = 11$)
V_{ps}	26.01 [15.03; 43.77]	31.17 [21.89; 52.16]**
V_s	0.51 [0.35; 0.71]	0.42 [0.29; 0.51]*
V_m	5.74 [2.13; 16.11]	11.05 [4.33; 25.63]*
V_d	1.46 [0.68; 2.89]	2.47 [0.29; 5.63]*
V_{pd}	0.08 [– 0.03; 0.18]	0.06 [– 0.02; 0.18]

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ различия достоверны на двустороннем уровне значимости.

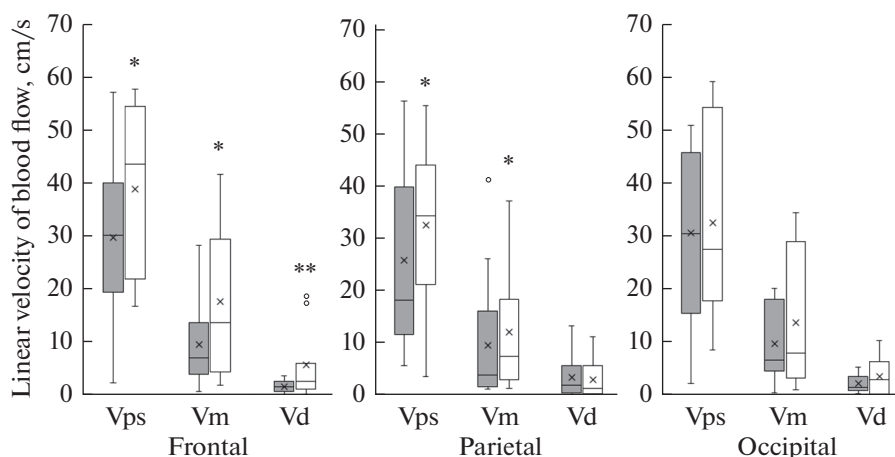


Рис. 1. Показатели линейных скоростей кровотока в различных участках полушарий головного мозга: лобном (frontal), теменном (parietal) и затылочном (occipital). Темная заливка – крысы в возрасте 4 мес., белая заливка – крысы в возрасте 18 мес. Верхняя и нижняя граница каждого прямоугольника – первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля) соответственно, поперечная линия внутри – медиана (50-й процентиль), крестик внутри – среднее арифметическое, концы отрезков 10-й и 90-й процентиля, точки – выбросы. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4 мес. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, U – критерий Манна–Уитни).

0.98] см/с у крыс в возрасте 4 мес.; 0.45 [0.33; 0.61] см/с у крыс в возрасте 18 мес.) (рис. 1).

В теменной области полушарий головного мозга у животных в возрасте 18 мес. по сравнению с более молодыми крысами увеличиваются показатели пиковой систолической (в среднем на 25%, $p = 0.03$, U = 792, критерий Манна–Уитни) и средней за сердечный цикл (в среднем на 21.54%, $p = 0.02$, U = 1341, критерий Манна–Уитни) скоростей кровотока (рис. 1).

Старение не влияет на показатели индекса резистентности. В то же время в лобной и теменной области полушарий головного мозга у крыс в возрасте 18 мес. отмечается снижение показателя индекса пульсации в среднем на 20% (рис. 2). Индекс STI, отражающий степень стеноза артерий, изменяется только в лобном регионе – увеличивается в среднем на 5.69% ($p = 0.02$, U = 612, критерий Манна–Уитни) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование показало, что старение сопровождается изменением параметров кровотока в коре и подкорковых структурах головного мозга крыс. У 18-месячных крыс по сравнению с более молодыми животными отмечается увеличение пиковых и средней за сердечный цикл скоростей кровотока. Изменения церебрального кровотока при старении во многом связывают с возрастными нарушениями скорости метаболизма и атрофией головного мозга [8]. Установлено, что возрастная атрофия имеет региональную изменчивость и более заметна в лобных, височных и теменных областях [12, 13]. В нашем исследовании у крыс в возрасте 18 мес. изменение скоростных параметров кровотока наблюдалось в лобной и теменной области полушарий головного мозга, в то время как в затылочном регионе достоверных изменений этих показателей по сравнению с аналогичными значениями у 4-месячных животных обнаружено не было. В лобной и теменной области было отмечено

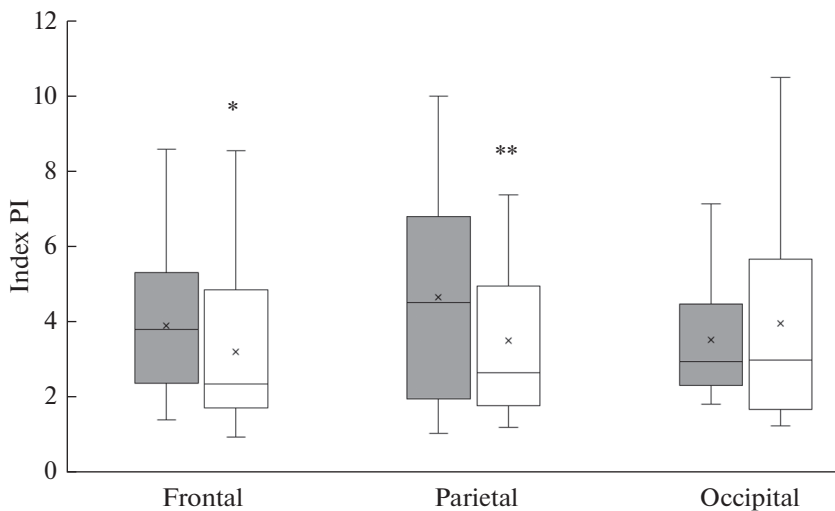


Рис. 2. Показатели пульсационного индекса в различных участках полушарий головного мозга: лобном (frontal), теменном (parietal) и затылочном (occipital). Темная заливка – крысы в возрасте 4 мес., белая заливка – крысы в возрасте 18 мес. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4 мес. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ U – критерий Манна–Уитни). Остальные обозначения как на рис. 1.

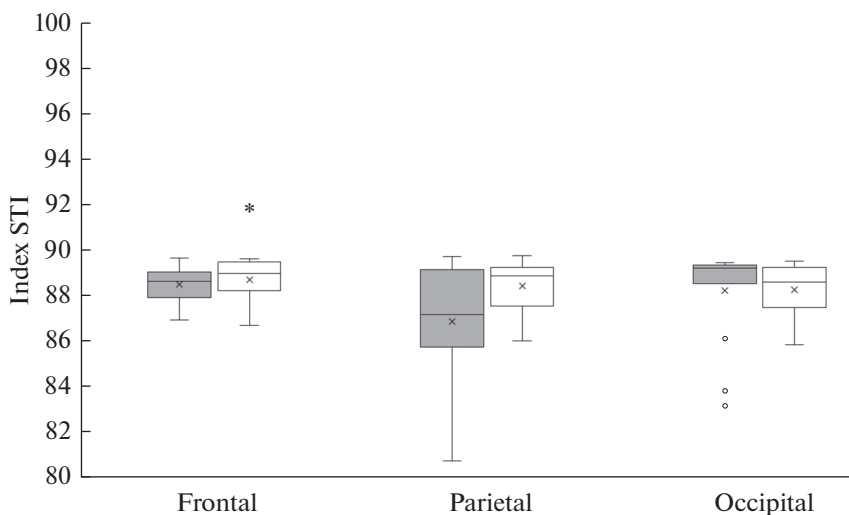


Рис. 3. Показатели индекса STI в различных участках полушарий головного мозга: лобном (frontal), теменном (parietal) и затылочном (occipital). Темная заливка – крысы в возрасте 4 мес., белая заливка – крысы в возрасте 18 мес. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4 мес. (* $p < 0.05$, U – критерий Манна–Уитни). Остальные обозначения как на рис. 1.

увеличение пиковой систолической и средней за сердечный цикл скорости кровотока. Это может указывать на развитие возрастных стенозирующих процессов, связанных со снижением тонуса, сужением и разрежением церебрального микроциркулярного русла [1, 3, 14, 15]. В лобной области полушарий также наблюдалось повышение конечной диастолической скорости кровотока (в среднем в 2 раза) и индекса STI, отражающего степень стеноза артерий, что может свидетельствовать о большей выраженности стеноза артерий в данном регионе по сравнению с другими участками полушарий головного мозга. Сужение просвета сосудов в сочетании с высокими пиковыми скоростями кровотока указывает на гиперперфузию [16]. Однако наши данные не соответствуют результатам других исследователей, полученных на людях и экспериментальных животных и свидетельствующих об отсутствии [6, 8, 9] или уменьшении мозгового кровотока [2, 5–7] при старении. Такие противоречия могут быть связаны с видовыми или регионарными различиями, возрастом и наличием сопутствующей патологии [8]. Нельзя не учитывать и того, что отличия в получаемых результатах могут быть обусловлены методическими особенностями. В наших экспериментах регистрировалась линейная скорость мозгового кровотока, тогда как авторы некоторых из цитируемых работ [2, 7, 8] оценивали объемную скорость кровотока. Исследование объемной скорости кровотока с одной стороны позволяет в большей степени проводить оценку коллатерального кровоснабжения перфузируемой зоны, но в то же время использование такого методического подхода может снизить чувствительность обнаружения изменений мозгового кровотока [7, 17]. Также возможно, что обнаруженная нами гиперперфузия лобных и затылочных областей полушарий головного мозга у 18-месячных крыс предшествует развитию последующих гипоперфузионных нарушений мозгового кровотока. Для сохранения нормальной функции мозга большое значение имеет поддержание адекватной церебральной перфузии через плотную микроциркулярную сеть [18–20]. В настоящее время появляется все больше доказательств того, что старение вызывает многогранные функциональные нарушения в микроциркуляции головного мозга. Согласно гипотезе капиллярной дисфункции, на ранних этапах старения для поддержания адекватной оксигенации мозга необходимо увеличение мозгового кровотока [21]. Но длительная гиперперфузия приводит к повреждению сосудов микроциркулярного русла [22, 23], нарушению нормальной регуляции церебральной перфузии артериолами и развитию гипоперфузии.

Максимальная систолическая скорость кровотока в определенной мере отражает эластичность стенок исследуемых сосудов и зависит от многих переменных (величины артериального давления, вязкости крови и др.). Конечная диастолическая скорость кровотока определяет состояние периферического сосудистого русла, но оба этих параметра отражают кровоток в конкретный период сердечного цикла, не давая информации об истинной скорости кровотока в сосуде за весь период сердечного цикла. Наиболее полное представление о движении частиц крови в сосуде дают величины не максимальных, а средних скоростей потока, которые являются более чувствительным параметром [24], и показатели индексов кровотока, позволяющие судить о величине сосудистого сопротивления [11, 25]. Согласно полученным нами результатам, у животных в возрасте 18 мес. по сравнению с более молодыми крысами в лобной области полушарий головного мозга снижается средняя систолическая скорость кровотока. Такие изменения могут указывать на активацию при старении коллатеральных путей кровотока в этом участке мозга, необходимую для поддержания адекватной перфузии [26]. Старение не влияет на показатели индекса резистентности, в то же время в лобной и теменной областях полушарий головного мозга у крыс в возрасте 18 мес. снижается показатель пульсационного индекса (в среднем на 20%). Наряду с увеличением конечной диастолической скорости кровотока снижение пульсационного индекса может косвенно свидетельство-

вать о снижении сосудистого сопротивления и тонуса сосудов [16, 26, 27]. В основе данных изменений, вероятно, лежит возрастное нарушение ауторегуляции церебральных сосудов [3].

Таким образом, установлено, что в 18-месячном возрасте у крыс отмечаются проявления нарушения мозговой гемодинамики. На фоне снижения уровня сопротивления мозговых сосудов, на что указывает увеличение конечной диастолической скорости кровотока и уменьшение индекса пульсации, наблюдается активация механизмов, направленных на поддержание адекватной перфузии ткани мозга. Увеличивается перфузия лобной и теменной областей полушарий головного мозга за счет повышения пиковых и средней за сердечный цикл скоростей кровотока, и активируются коллатеральные пути кровоснабжения мозга, о чем свидетельствует снижение средней систолической скорости кровотока в лобной области полушарий.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источник финансирования – госбюджет. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019-2030), тема 0134-2019-0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи выполнены автором лично.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Diaz-Otero JM, Garver H, Fink GD, Jackson WF, Dorrance AM* (2016) Aging is associated with changes to the biomechanical properties of the posterior cerebral artery and parenchymal arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310(3): H365–H375. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00562.2015>
2. *Staffaroni AM, Cobigo Y, Elahi FM, Casaletto KB, Walters SM, Wolf A, Lindbergh CA, Rosen HJ, Kramer JH* (2019) A longitudinal characterization of perfusion in the aging brain and associations with cognition and neural structure. *Hum Brain Mapp* 40(12): 3522–3533. <https://doi.org/10.1002/hbm.24613>
3. *Toth P, Tarantini S, Csiszar A, Ungvari Z* (2017) Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312(1): H1–H20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00581.2016>
4. *Hshieh TT, Dai W, Cavallari M, Guttman CR, Meier DS, Schmitt EM, Dickerson BC, Press DZ, Marcantonio ER, Jones RN, Trivison TG, Fong TG, Ngo L, Inouye SK, Alzop DC; SAGES Study Group* (2017) Cerebral blood flow MRI in the nondemented elderly is not predictive of post-operative delirium but is correlated with cognitive performance. *J Cereb Blood Flow Metab* 37(4): 1386–1397. <https://doi.org/10.1177/0271678X16656014>
5. *Aanerud J, Borghammer P, Chakravarty MM, Vang K, Rodell AB, Jónsdóttir KY, Møller A, Ashkanian M, Vafaee MS, Iversen P, Johannsen P, Gjedde A* (2012) Brain energy metabolism and blood flow differences in healthy aging. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(7): 1177–1187. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.18>
6. *Nemati M, Bavit AS, Taheri N* (2009) Comparison of normal values of Duplex indices of vertebral arteries in young and elderly adults. *Cardiovasc Ultrasound* 7: 2. <https://doi.org/10.1186/1476-7120-7-2>
7. *Zhang N, Gordon ML, Goldberg TE* (2017). Cerebral blood flow measured by arterial spin labeling MRI at resting state in normal aging and Alzheimer’s disease. *Neurosci Biobehav Rev* 72:

- 168–175.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.11.023>
8. *Claassen JAHR, Thijssen DHJ, Panerai RB, Faraci FM* (2021) Regulation of cerebral blood flow in humans: physiology and clinical implications of autoregulation. *Physiol Rev* 101(4): 1487–1559. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2020>
 9. *Yazici B, Erdogmus B, Tugay A* (2005) Cerebral blood flow measurements of the extracranial carotid and vertebral doppler ultrasonography in healthy adults. *Diagn Interv Radiol* 11: 195–198.
 10. *Вознюк ИА, Полушин АЮ, Степанов ЕА* (2013) Количественная оценка ультразвуковых параметров мозгового кровотока (значение и норма). Регионарн кровообращ и микроциркул 12(4): 30–40. [*Voznyuk IA, Polushin AYU, Stepanov EA* (2013) Quantitative estimation of the parameters of ultrasonic cerebral blood flow (value and norm). *Region Blood Circulat and Microcircul* 12(4): 30–40. (In Russ)].
 11. *Lee MY, Wu CM, Chu CS, Lee KT, Sheu SH, Lai WT* (2008) Association of carotid hemodynamics with risk of coronary heart disease in a Taiwanese population with essential hypertension. *Am J Hypertens* 21(6): 696–700.
<https://doi.org/10.1038/ajh.2008.160>
 12. *Mander BA, Rao V, Lu B, Saletin JM, Lindquist JR, Ancoli-Israel S, Jagust W, Walker MP* (2014) Prefrontal atrophy, disrupted NREM slow waves and impaired hippocampal-dependent memory in aging. *Nat Neurosci* 16: 357–364.
<https://doi.org/10.1038/nn.3324>
 13. *Oh H, Madison C, Villeneuve S, Markley C, Jagust WJ* (2014) Association of gray matter atrophy with age, β -amyloid, and cognition in aging. *Cereb Cortex* 24: 1609–1618.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bht017>
 14. *Sokolova IB, Sergeev IV, Fedotova OR, Dvoretzkiy DP* (2014) Age-related changes of microcirculation in pial blood vessels of the sensorimotor cortex of the rat brain. *Advanc Gerontol* 4(2): 145–149.
<https://doi.org/10.1134/S207905701402012X>
 15. *Sonntag WE, Lynch C, Thornton P, Khan A, Bennett S, Ingram R* (2000) The effects of growth hormone and IGF-1 deficiency on cerebrovascular and brain ageing. *J Anat* 197(4): 575–585.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19740575.x>
 16. *Heyer EJ, Mergeche JL, Connolly ES Jr* (2014) Middle cerebral artery pulsatility index and cognitive improvement after carotid endarterectomy for symptomatic stenosis. *J Neurosurg* 120(1): 126–131.
<https://doi.org/10.3171/2013.8.JNS13931>
 17. *Dahl A, Russell D, Nyberg-Hansen R, Rootwelt K, Bakke SJ* (1994) Cerebral vasoreactivity in unilateral carotid artery disease. A comparison of blood flow velocity and regional cerebral blood flow measurements. *Stroke* 25(3): 621–626.
<https://doi.org/10.1161/01.str.25.3.621>
 18. *De Silva TM, Faraci FM* (2016) Microvascular dysfunction and cognitive impairment. *Cell Mol Neurobiol* 36: 241–258.
<https://doi.org/10.1007/s10571-015-0308-1>
 19. *Iadecola C* (2010) The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol* 120: 287–296.
<https://doi.org/10.1007/s00401-010-0718-6>
 20. *Wang N, Allali G, Kesavadas C, Noone ML, Pradeep VG, Blumen HM, Verghese J* (2015) Cerebral small vessel disease and motoric cognitive risk syndrome: results from the Kerala–Einstein Study. *J Alzheimers Dis* 50: 699–707.
<https://doi.org/10.3233/JAD-150523>
 21. *Wierenga CE, Hays CC, Zatar ZZ* (2014) Cerebral blood flow measured by arterial spin labeling MRI as a preclinical marker of Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 42: S411–S419.
<https://doi.org/10.3233/JAD-141467>
 22. *Ghaffari M, Alaraj A, Du X, Zhou XJ, Charbel FT, Linninger AA* (2018). Quantification of near-wall hemodynamic risk factors in large-scale cerebral arterial trees. *Int J Numer Method Biomed Eng* 34(7): e2987.
<https://doi.org/10.1002/cnm.2987>
 23. *O’Rourke MF, Safar ME* (2005) Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* 46: 200–204.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000168052.00426.65>
 24. *Невзорова ВА, Шуматов ВВ, Настредин ОВ, Захарчук НВ* (2012) Состояние функции сосудистого эндотелия у лиц с факторами риска и больных ишемической болезнью сердца. Тихоокеанск мед журн 2: 37–44. [*Nevzorova VA, Shumatov VB, Nastradin OV, Zakharchuk NV* (2012) The state of vessel endothelium in patients with risk factors and ischemic heart disease. *Pacific Med J* 2: 37–44. (In Russ)].
 25. *Soinne L, Helenius J, Tatlisumak T, Saimanen E, Salonen O, Lindsberg PJ, Kaste M* (2003) Cerebral hemodynamics in asymptomatic and symptomatic patients with high-grade carotid ste-

- nosis undergoing carotid endarterectomy. *Stroke* 34(7): 1655–1661.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000075605.36068.D9>
26. Guan J, Zhang S, Zhou Q, Li C, Lu Z (2013) Usefulness of transcranial Doppler ultrasound in evaluating cervical-cranial collateral circulations. *Interv Neurol* 2(1): 8–18.
<https://doi.org/10.1159/000354732>
27. Albina G, Fernandez Cisneros L, Laiño R, Nobo UL, Ortega D, Schwarz E, Barja L, Lagos R, Ginziger A, Ameriso SF (2004) Transcranial Doppler monitoring during head upring tilt table testing in patient with suspected neurocardiogenic syncope. *Europace* 6(1): 63–69.
<https://doi.org/10.1016/j.eupc.2003.09.009>

Changes in the Velocity Indicators of Cerebral Blood Flow in Rats during Aging

O. P. Gorshkova*

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

**e-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

The age-related changes in the velocity indicators of cerebral blood flow were studied. Using Doppler ultrasound the state of blood flow in the cortex and subcortical structures of the cerebral hemispheres was analyzed by the value of linear velocities and blood flow indexes in 4 and 18-months-old Sprague-Dawley rats. It has been established that at the age of 18 months in rats the perfusion of the frontal and parietal areas of the cerebral hemispheres increases due to the increase in peak systolic, end diastolic and mean velocity per cardiac cycle; the collateral pathways of blood supply to the brain are activated, as evidenced by the decrease in the mean systolic blood flow velocity in the frontal area of the hemispheres; the overall level of peripheral vascular resistance decreases, as indicated by an increase in end diastolic velocity and a decrease in Gosling pulsatility index. The detected changes are probably the primary adaptive manifestations of cerebrovascular accidents aimed at maintaining adequate perfusion of aging brain tissue.

Keywords: cerebral blood flow velocity, Doppler ultrasound, aging

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА И СОСТОЯНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК
ТВЕРДОЙ МОЗГОВОЙ ОБОЛОЧКИ КРЫСЫ

© 2022 г. К. С. Королёва¹, *, С. О. Свитко¹, Д. А. Нурмиева¹, О. Ш. Гафуров¹,
А. Д. Буглинина¹, Г. Ф. Ситдикова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: k.s.koroleva@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.2022 г.

После доработки 12.05.2022 г.

Принята к публикации 12.05.2022 г.

Оксид азота (NO) – представитель семейства газомедиаторов, участвующих в регуляции различных биологических процессов. Нитроглицерин, донор NO, широко используется для моделирования мигрени как у человека, так и у животных. Однако роль периферических нейрональных структур в эффектах NO практически не изучена. Целью работы являлось выявление эффектов NO на электрическую активность тройничного нерва и состояние тучных клеток оболочек головного мозга крыс. В работе использовали электрофизиологический метод регистрации потенциалов действия (ПД) тройничного нерва крыс, иннервирующего твердую мозговую оболочку, в препарате полочерепа крысы. Для анализа электрической активности использовали метод кластеризации, позволяющий разбить ПД на группы с близкими характеристиками, генерируемые отдельными волокнами. Морфологию тучных клеток оценивали путем окрашивания оболочек головного мозга крыс толуидиновым синим. Субстрат синтеза NO – L-аргинин дозозависимо увеличивал электрическую активность тройничного нерва, и этот эффект отменялся на фоне блокатора синтеза NO – L-NAME (100 мкМ). Экзогенный донор NO – нитропруссид натрия (НПН 200 мкМ) вызывал усиление частоты ПД, тогда как инактивированный светом НПН не оказывал влияния на частоту ПД. Использование кластерного анализа выявило, что НПН вызывал сначала увеличение частоты ПД низкой амплитуды, распространяющиеся с низкой скоростью в волокнах С-типа, отвечающих на капсаицин; затем наблюдалось появление высокоамплитудных ПД, распространяющихся в Аδ-волокнах. Блокатор растворимой гуанилатциклазы – ODQ (10 мкМ) предотвращал НПН-вызванное увеличение электрической активности. При этом инкубация препарата в НПН не оказывала влияния на морфологию тучных клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что как экзогенный, так и эндогенный NO усиливают электрическую активность тройничного нерва путем активации гуанилатциклазы, оказывая вклад в периферические нейрональные механизмы возникновения боли при мигрени.

Ключевые слова: оксид азота, L-аргинин, мигрень, крыса, тройничный нерв, гуанилатциклаза, тучные клетки

DOI: 10.31857/S0869813922060048

Оксид азота (NO) – газообразная сигнальная молекула, вовлеченная в регуляцию широкого спектра физиологических процессов и клеточных функций в орга-

низме человека [1–5]. NO продуцируется внутриклеточно в результате окисления L-аргинина с образованием NO и L-цитруллина с помощью фермента NO-синтазы (NOS), которая существует в виде трех изоформ: нейрональная NOS (nNOS), эндотелиальная NOS (eNOS) и индуцибельная NOS (iNOS). nNOS и eNOS являются конститутивными и активируются в ответ на повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и его последующего связывания с кальмодулином [6]. nNOS преимущественно экспрессируется в нейронах и обнаруживается как в центральной, так и в периферической нервной системе [6, 7]. В менингеальных оболочках eNOS была обнаружена в эндотелии средней менингеальной артерии, nNOS – в тонких разветвлениях нервных волокон, располагающихся вдоль артерии, при этом только небольшая доля нейронов тройничного ганглия является NOS-позитивной [8].

NO играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов, в том числе и церебральных, а также в механизмах ноцицепции [6]. Это позволяет рассматривать NO в качестве “ключевого звена” в формировании мигрени [9], в основе которой лежат сосудистые и нейрональные изменения [10, 11]. Действительно, донор NO – нитроглицерин используется для моделирования мигрени у человека, а также в экспериментальных моделях мигрени у животных, а специфические ингибиторы NO-синтаз проявляют обезболивающие эффекты у испытуемых, страдающих мигренью [12].

Растворимая гуанилатциклаза является основным рецептором для NO в организме, хотя NO также может иметь независимые от гуанилатциклазы эффекты [13], такие как изменение возбудимости нейронов за счет активации или ингибирования ионных каналов [14], стимуляция синтеза и высвобождения кальцитонинген-связанного пептида (CGRP) [15–17], а также влияние на состояние тучных клеток [18–20]. Кроме того, NO может взаимодействовать с другой газообразной молекулой, образующейся в тройничном ганглии, сероводородом (H_2S) с образованием нитрозила, способного активировать TRPA1-рецепторы, увеличивая высвобождение CGRP [21, 22].

Достоверно известно, что боль во время приступа мигрени вызывается сенсibilизацией/активацией периферических отростков тройничного нерва, находящихся в менингеальных тканях, где формируется начальный ноцицептивный сигнал [23, 24]. Однако данные о влиянии донора NO на активность афферентов оболочки головного мозга неоднозначны. Показано, что NO может как увеличивать, так и снижать чувствительность ноцицепторов в зависимости от исходного уровня возбудимости [25].

Известно, что активация иммунной системы оказывает вклад в патогенез мигрени [26]. В твердой мозговой оболочке наблюдается многочисленное скопление тучных клеток, которые локализованы вблизи сосудов и нервных волокон тройничного нерва [27, 28]. Тучные клетки содержат и могут высвобождать провоспалительные медиаторы, которые вносят вклад в поддержание длительной ноцицептивной импульсации в афферентах тройничного нерва во время приступа мигрени [29–31]. Согласно некоторым данным, тучные клетки экспрессируют NO-синтазы и сами продуцируют NO [32–34].

Целью настоящей работы являлся анализ роли оксида азота в регуляции возбудимости периферических структур твердой мозговой оболочки, участвующих в генерации ноцицептивных сигналов. Для этого мы исследовали эффекты субстрата синтеза NO – L-аргинина и экзогенного донора NO – нитропрусида натрия (НПН) на электрическую активность тройничного нерва крысы. Мы также оценили роль гуанилатциклазы в эффектах НПН и состояние тучных клеток твердой оболочки головного мозга при действии НПН.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрофизиологический метод регистрации потенциалов действия тройничного нерва

Эксперименты проводились на самцах крыс линии Wistar возраста P40–45 (P – день рождения). Все экспериментальные протоколы соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными, принятым в Казанском Федеральном Университете и одобрены Локальным этическим комитетом КФУ (протокол 33 от 25.11.2021). Для изучения электрических сигналов, возникающих в периферическом отростке тройничного нерва, мы использовали препарат изолированного черепа крысы, представляющий из себя половину черепной коробки с извлеченным головным мозгом [35–37]. После декапитации черепная коробка крысы тщательно очищалась от наружных черепных мышц. Череп разделялся сагиттальным разрезом на две половины, мозг аккуратно извлекался с помощью пинцета из черепной коробки, оставляя нетронутой твердую мозговую оболочку (*dura mater*). В твердой оболочке мозга сохраняли отростки тройничного нерва (*nervus spinosus*), иннервирующие среднюю менингеальную артерию.

Препарат постоянно перфузировался физиологическим раствором следующего состава (в мМ): NaCl 120, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, глюкоза 11, Na₂HPO₄ 1, NaHCO₃ 24, pH 7.2–7.4 с постоянной аэрацией карбогеном (O₂ 95%/CO₂ 5%). Регистрирующие электроды были изготовлены из боросиликатных заготовок фирмы “Sutter instrument”, диаметр кончика электрода составлял 150 мкм. Перед началом эксперимента стеклянный электрод фиксировался в держателе с манипулятором, подключенному к предусилителю электрических сигналов. Под визуальным контролем из твердой мозговой оболочки выделяли периферический отросток тройничного нерва, *nervus spinosus* (V1-ветвь тройничного нерва), иннервирующих среднюю менингеальную артерию, и помещали его в стеклянный регистрирующий электрод. Далее осуществляли запись потенциалов действия (ПД) при помощи усилителя DAM 80 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, США). Вначале регистрировалась базовая электрическая активность тройничного нерва. Затем в область расхождения средней менингеальной артерии апплицировали интересующие нас вещества и записывали их действие на протяжении 20–40 мин, после чего проводили отмывку. В экспериментах использовали: нитропруссид натрия (НПН) в концентрациях 100 и 200 мкМ, НПН, инактивированный светом в концентрации 200 мкМ; L-аргинин в концентрациях 100, 200 и 300 мкМ. Каждая исследуемая концентрация НПН и L-аргинина тестировалась на новом препарате. Запись ПД при воздействии тестируемых соединений осуществлялась на протяжении 20 мин. Также был использован 1H-[1, 2, 4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) – ингибитор гуанилатциклазы, 10 мкМ; в котором препарат инкубировался на протяжении 20 мин, после чего осуществлялась запись ПД в растворе с добавлением НПН (200 мкМ) на фоне ODQ (20 мин). N(G)-Nitro-L-arginine (L-NAME), 100 мкМ, в котором препарат инкубировался на протяжении 30 мин, после чего в раствор добавлялся L-аргинин (300 мкМ) на 20 мин. Для активации ноцицептивных пептидергических C-волокон в конце эксперимента апплицировали капсаицин в концентрации 1 мкМ. Сигналы были оцифрованы на ПК с использованием платы NI PCI6221 (National Instruments, Austin, TX, США). Сигналы визуализировались и анализировались с использованием программного обеспечения WinEDR v.3.2.7 (University of Strathclyde, Glasgow, Великобритания). Частота рассчитывалась как количество ПД за 5 мин. Контролем для сравнения в каждом эксперименте служил пятиминутный отрезок записи перед подачей исследуемого вещества.

Кластерный анализ потенциалов действия

Экспериментальные данные записывались и проходили первоначальную фильтрацию с помощью усилителя в полосе 100–3000 Гц. Оцифрованные данные фильтровались с помощью фильтра Чебышева типа II. Для обнаружения сигналов выбирался интервал 20 с без ПД в начале каждого эксперимента, где рассчитывалась дисперсия шума. Поиск ПД осуществлялся по превышению амплитуды больше пяти стандартных отклонений базового шума. Амплитуда каждого найденного сигнала была нормализована по базовому шуму и выражена в относительных единицах (о.е.). Для каждого найденного ПД определялись амплитудно-временные параметры такие как: амплитуда положительной и отрицательной фазы, время нарастания; длительности фаз спайка; время спада. Для анализа активности отдельных нервных волокон проводили разделение ПД на группы – кластеризацию в соответствии с амплитудно-временными параметрами. Для кластеризации использовали метод KlustaKwik [38]. Проведение кластеризации, построение графиков и гистограмм были выполнены с помощью программного обеспечения MATLAB (MathWorks, Natick, MA, США).

Исследование дегрануляции тучных клеток

Исследование дегрануляции тучных клеток осуществлялось с помощью гистологического метода окрашивания твердой оболочки мозга крыс (P35–40) толуидиновым синим [39]. Интактные черепа были помещены в раствор Кребса с исследуемыми растворами (НПН в концентрации 100 и 200 мкМ) на 30 мин в полной темноте для предотвращения диссоциации НПН, после чего полочерепа помещались в параформальдегид (4%-ный раствор) на 12 ч. Перед выделением мозговых оболочек черепа промывали в фосфатно-солевом буферном растворе следующего состава (мМ): 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 1.8 K₂HPO₄. Выделенные оболочки фиксировали на предметном стекле. Окрашивание толуидиновым синим длилось 10 мин, затем фиксированные препараты омывались дистиллированной водой и обезвоживались этиловым спиртом (95–99%). Съемка осуществлялась при 20× увеличении. Степень дегрануляции оценивали визуально, расчет велся в % от общего количества клеток (не менее 100).

Статистическая обработка

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Origin Pro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, США), Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, США) и GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, США). Нормальность распределения выборки определяли при помощи F-теста Фишера и критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$; n указывает количество животных. В тексте данные представлены как среднее и SE, где SE — стандартная ошибка. Критерий хи-квадрат использовался для определения значимости между количественным распределением кластеров электрической активности нерва при воздействии экзогенного донора NO.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Многочисленные данные указывают на то, что головные боли при мигрени возникают в результате активации окончаний тройничного нерва в мозговых оболочках с последующей сенсibilизацией нейронов [10, 40]. Для анализа роли эндогенного NO в регуляции активности тройничного нерва использовали субстрат NO-синта-

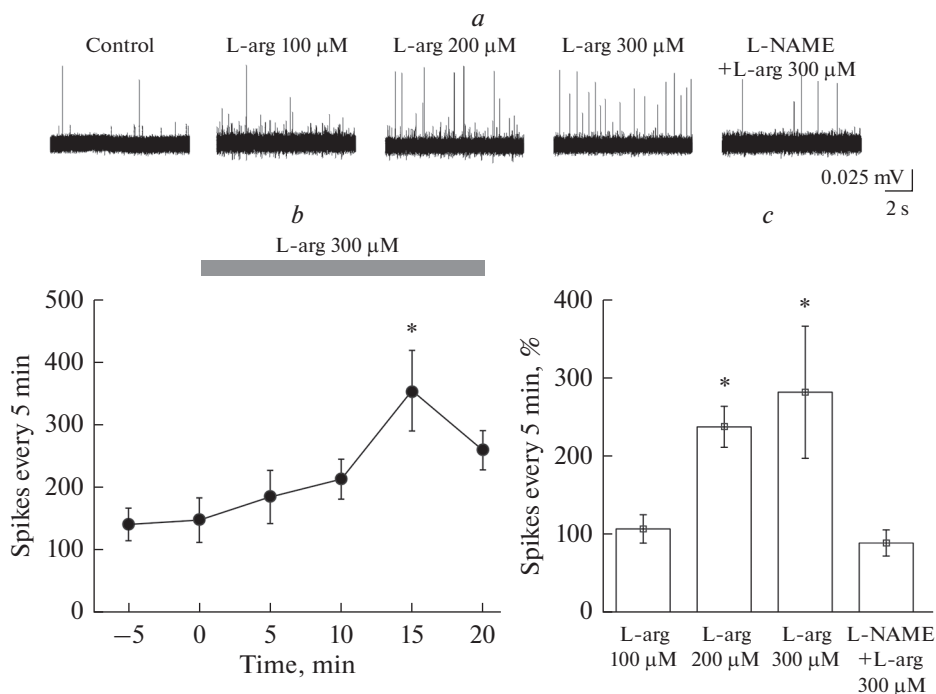


Рис. 1. Влияние L-аргинина на частоту потенциалов действия в тройничном нерве крысы. *a* – пример записи ПД в тройничном нерве крысы в контроле и после аппликации L-аргинина (L-arg) в концентрациях 100, 200 и 300 мкМ и L-arg (300 мкМ) на фоне ингибитора NO-синтазы, L-NAME (100 мкМ); *b* – изменение частоты ПД (число ПД за 5 мин) в абсолютных значениях во времени при аппликации L-arg в концентрации 300 мкМ; *c* – средняя частота ПД за 5 мин (%) при аппликации L-arg в концентрациях 100, 200 и 300 мкМ и L-arg на фоне L-NAME (100 мкМ) по сравнению с контрольными значениями, принятыми за 100% (* $p < 0.05$; парный тест Вилкоксона).

зы – L-аргинин. L-аргинин в концентрации 100 мкМ не вызывал изменения частоты ПД в течение 20 мин действия (рис. 1). Частота ПД в контроле составила 421.6 ± 135.7 ПД за 5 мин и к 15-й мин действия L-аргинина – 417.6 ± 107.6 ПД за 5 мин ($n = 4$, $p = 1$; рис. 1*a*, *c*). L-аргинин в концентрации 200 мкМ вызывал увеличение частоты ПД с 292.1 ± 73.1 ПД за 5 мин в контроле до 661.6 ± 150.8 ПД за 5 мин к 15-й мин ($n = 4$; $p = 0.04$) и к 20-й мин частота ПД составила 439.8 ± 128.1 ПД за 5 мин ($n = 4$; $p = 0.18$), прирост частоты составил $138 \pm 26\%$ к концу 15-й мин ($n = 4$; рис. 1*a*, *c*). Максимальное увеличение частоты ПД наблюдалось при использовании L-аргинина в концентрации 300 мкМ, которое составило 357.4 ± 64.4 ПД за 5 мин, а к 15-й мин (в контроле – 150.2 ± 35.6 ПД за 5 мин) прирост составил $182 \pm 84\%$ ($n = 4$; рис. 1*b*, *c*).

Блокатор NO-синтазы L-NAME не изменял базовую частоту ПД в афферентах тройничного нерва. В контроле частота ПД составила 306.8 ± 73.1 ПД за 5 мин, к 15-й мин инкубации в L-NAME частота ПД составила 365.8 ± 105.1 ПД за 5 мин ($p = 0.72$); к 20-й мин – 369.4 ± 55.2 ПД за 5 мин ($n = 4$; $p = 0.52$). L-аргинин (300 мкМ) на фоне L-NAME не вызывал увеличения частоты ПД в течение всего времени аппликации: частота ПД к 15-й мин составила – 264.6 ± 33.7 ПД за 5 мин ($n = 4$; $p = 0.18$; рис. 1*a*, *c*).

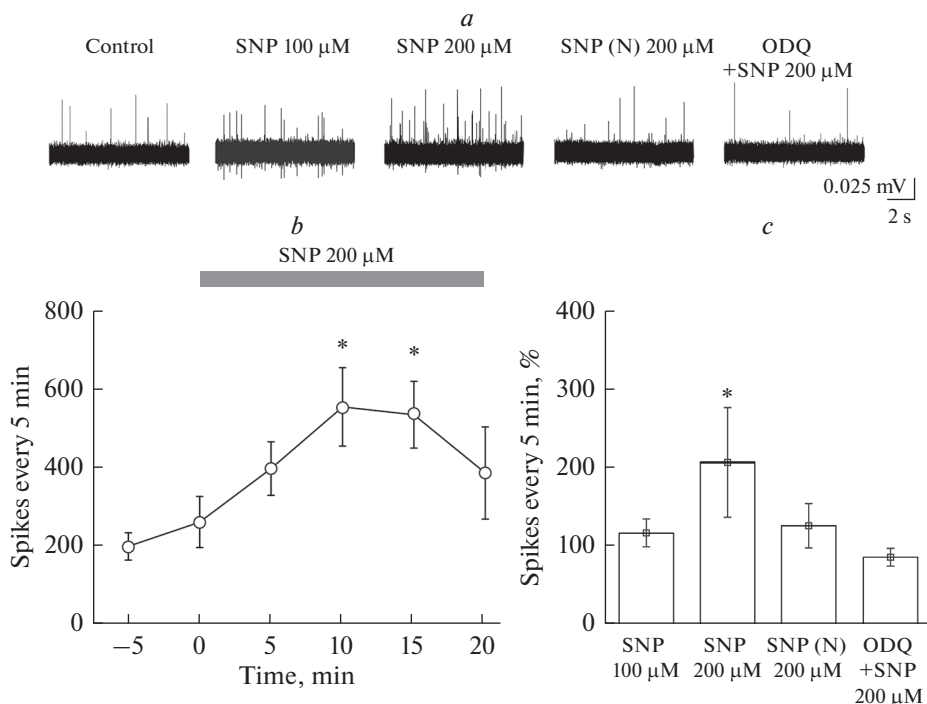


Рис. 2. Влияние нитропруссид натрия (SNP) на частоту потенциалов действия в тройничном нерве крысы. *a* – пример записи ПД в тройничном нерве крысы в контроле, при аппликации SNP в концентрациях 100 и 200 мкМ, а также инактивированного светом (SNP (N)) и SNP (200 мкМ) на фоне ODQ (10 мкМ); *b* – динамика изменения средней частоты ПД за 5 мин при аппликации SNP в концентрации 200 мкМ; *c* – средняя частота ПД за 5 мин в %, возникающих при аппликации SNP в концентрациях 100 и 200 мкМ, инактивированного светом (SNP (N)) и SNP на фоне ODQ (10 мкМ) по отношению контрольным значениям, принятым за 100% (* $p < 0.05$; парный тест Вилкоксона).

Донор NO, НПН в концентрации 100 мкМ не оказывал влияния на электрическую активность тройничного нерва ($p > 0.05$; $n = 5$; рис. 2*a, c*). В контроле частота составила 454.8 ± 111.4 ПД за 5 мин, после добавления НПН к 15-й мин – 672.8 ± 163.4 ПД за 5 мин ($n = 5$, $p = 0.29$). Увеличение концентрации НПН до 200 мкМ вызывало двукратное повышение частоты ПД с 260.4 ± 64.8 ПД за 5 мин в контроле до 552.5 ± 99.3 ПД к 10-й мин ($p = 0.04$); 532.7 ± 84.8 ПД к 15-й мин ($p = 0.01$) и 476.7 ± 154.8 ПД за 5 мин к 20-й мин инкубации ($p = 0.15$; $n = 4$; рис. 2*b*). Прирост частоты ПД составил $109 \pm 42\%$ (рис. 2*c*). Поскольку НПН при диссоциации образует дисульфидные соединения и цианид-ионы [9], нами был использован инактивированный на свету НПН. Инактивированный светом НПН (Ин) в концентрации 200 мкМ не изменял активность тройничного нерва (частота ПД в контроле составила 716.7 ± 220.9 ПД за 5 мин; в присутствии НПН (Ин) – 972.5 ± 298.3 ПД за 5 мин к 10-й мин аппликации ($p = 0.62$); 876.7 ± 287.6 ПД за 5 мин к 15-й мин ($p = 0.37$); 840.1 ± 196.6 ПД за 5 мин к 20-й мин; $p = 0.37$; $n = 4$; рис. 2*a, c*).

Для выявления роли растворимой гуанилатциклазы в эффектах NO использовали ингибитор ODQ в концентрации 10 мкМ. Инкубация препарата в ODQ в течение 20 мин не приводила к изменениям частоты ПД ($n = 4$; $p = 0.87$). Базовая частота ПД в тройничном нерве составила 187.5 ± 86.2 ПД за 5 мин и 172.5 ± 30.1 ПД за

5 мин после 20-минутной инкубации в ODQ (10 мкМ) ($n = 4$; $p = 0.87$). Последующее добавление НПН (200 мкМ) не вызывало достоверного изменения частоты ПД и к 10-й мин аппликации частота ПД составила 145.2 ± 47.3 ПД за 5 мин и к 15-й мин 129.7 ± 50.8 ПД за 5 мин ($p = 0.62$); 20 мин 127.1 ± 40.3 ПД за 5 мин ($n = 4$; $p = 0.12$; рис. 2с).

Регистрируемые нами ПД отличались амплитудно-временными параметрами, такими как амплитуда, время роста, постоянная спада и др. Например, амплитуда ПД могла составлять от 35 до 120 мкВ. Такое широкое варьирование амплитудно-временных параметров можно объяснить уникальными свойствами различных нервных волокон и особенностями регистрации ПД с помощью подсасывающего электрода. Используемый нами метод кластеризации [36] позволил разбить регистрируемые ПД на группы или кластеры с близкими характеристиками, которые, как было предположено, сформированы одним волокном. Поэтому считается, что активность возникновения ПД в кластере отражает активность возникновения ПД в отдельном нервном волокне. Применение агониста TRPV1-рецепторов, капсаицина (1 мкМ), позволило выявить пептидергические капсаицин-чувствительные С-волокна [41, 42]. С использованием кластерного анализа нами было получено следующее распределение кластеров при аппликации НПН и капсаицина: отвечающие только на аппликацию НПН (рис. 3а(а)); НПН и капсаицина (рис. 3а(б)); только капсаицина (рис. 3а(с)) и не отвечающие (рис. 3а(д)).

Аппликация НПН в концентрации 100 мкМ приводила к повышению частоты ПД в 18% кластерах. В 13% кластеров наблюдалось увеличение частоты ПД в ответ и на НПН, и на капсаицин (рис. 3б(а), $n = 7$). Повышение концентрации НПН до 200 мкМ привело к увеличению доли кластеров, отвечающих только на НПН (25% кластеров) и одновременно отвечающих на НПН и капсаицин (20% кластеров) (рис. 3б(б), $n = 7$). В обеих сериях экспериментов около 50% кластеров отвечали только на капсаицин и процент “молчащих” кластеров составил 20% при действии НПН 100 мкМ и 10% при действии НПН 200 мкМ (рис. 3б). Сравнение количественного распределения кластеров электрической активности нерва показало, что при воздействии более высоких концентрациях НПН (200 мкМ) наблюдается не только увеличение частоты, но и увеличение общего числа кластеров. В контроле общее число кластеров составило 52, после добавления НПН 200 мкМ число кластеров составило 74 ($\chi^2 = 3.98$; $p = 0.04$; $n = 7$). При воздействии НПН 100 мкМ общее число кластеров составило 71, сопоставимо с количеством в контроле (81 кластер, $n = 7$). Кроме того, было показано достоверное увеличение количества кластеров “отвечающих” на НПН 200 мкМ (42 кластеров, по сравнению с НПН 100 (14 кластеров); $\chi^2 = 9.78$; $p = 0.01$; $n = 7$).

Далее был проведен анализ вклада ПД различной амплитуды в эффекты НПН. Для этого были выделены кластеры низкоамплитудных (рис. 3с, красная колонка), среднеамплитудных (рис. 3с, зеленая колонка) и высокоамплитудных (рис. 3с, синяя колонка) ПД. Оказалось, что основной вклад в активность тройничного нерва вносят низкоамплитудные ПД. Аппликация НПН в концентрации 100 мкМ не оказала заметного влияния на распределение ПД различной амплитуды, тогда как НПН 200 мкМ вызывал усиление частоты ПД низкой амплитуды, так и кластеров высокоамплитудных ПД (рис. 3с).

Исследование роли донора оксида азота на состояние тучных клеток

Тучные клетки в избытке присутствуют в твердой мозговой оболочке, окружая сосуды и нервные окончания, а состояние тучных клеток может оказывать влияние на возбудимость нейрональной мембраны вследствие выделения различных активных молекул [29, 30, 43]. Для исследования эффектов NO на состояние тучных кле-

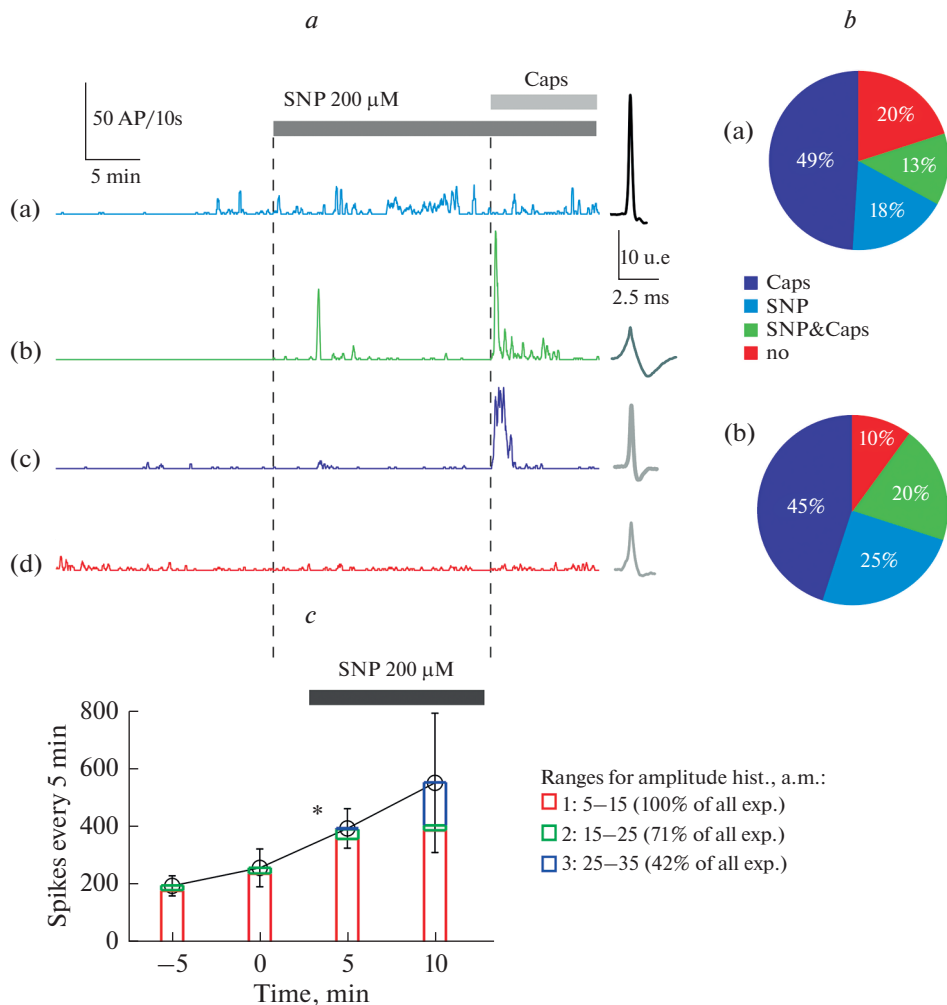


Рис. 3. Кластерный анализ электрической активности тройничного нерва при действии донора NO нитропруссид натрия. *a* – Примеры частотной активности различных кластеров при аппликации 200 мкМ SNP и 1 мкМ капсаицина (Caps). *a* (a, b) – кластеры с выраженным ответом на SNP 200 мкМ; *a* (c, d) – кластеры без выраженного ответа на SNP 200 мкМ. *b* – Круговая диаграмма распределения кластеров по типам ответов на SNP и Caps (в процентах к общему количеству кластеров): *a* – SNP 100 мкМ; *b* – SNP 200 мкМ; *c* – Изменение частоты ПД низкой, средней и высокой амплитуды в контроле и на фоне SNP 200 мкМ (* $p < 0.05$).

ток интактные оболочки мозга инкубировали в растворе НПН в концентрациях 100 и 200 мкМ в течение 30 мин. В качестве положительного контроля был использован Comround 48/80 (10 мкг/мл), дегранулирующий тучные клетки [44]. Инкубация оболочек головного мозга крысы в растворе, содержащем Comround 48/80 (10 мкг/мл), в течение 30 мин приводила к увеличению числа дегранулированных тучных клеток, которое составило $91.1 \pm 3.4\%$ ($n = 5$; рис. 4a(b), b). Инкубация оболочек в НПН не приводила к изменению морфологии тучных клеток, и количество дегранулированных клеток не превышало контрольные значения. В контрольной

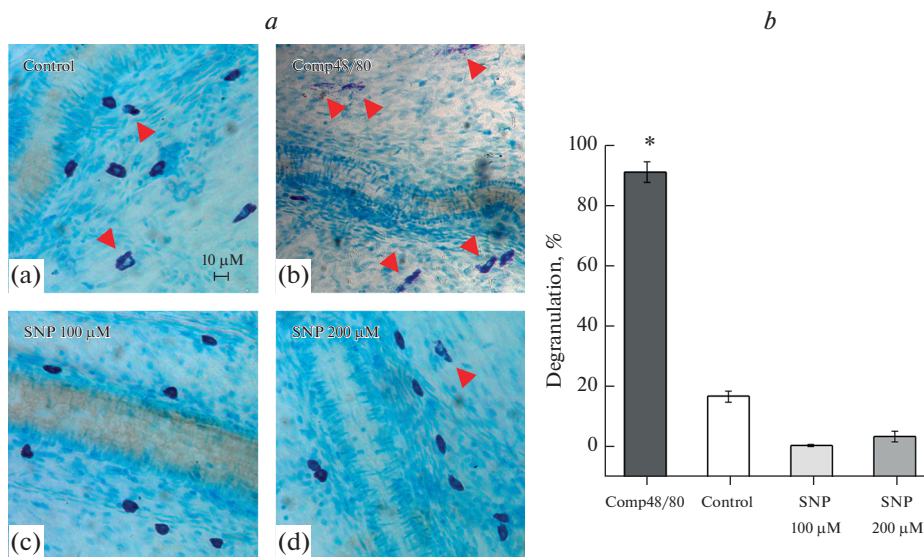


Рис. 4. Влияние нитропруссид натрия на морфологию тучных клеток. *a* – оригинальные снимки окрашенных оболочек головного мозга крыс толуидиновым синим в контроле ($n = 5$); после инкубации в Compound 48/80 (10 мкг/мл; $n = 5$); SNP (100 мкМ; $n = 5$); SNP (200 мкМ; $n = 4$). *b* – Уровень дегрануляции тучных клеток в контроле, при действии Compound 48/80, SNP в концентрациях 100 и 200 мкМ ($*p < 0.05$; U-критерий Манна–Уитни).

группе число дегранулированных тучных клеток составило $16.6 \pm 1.34\%$ ($n = 5$; рис. 4*a*(*a*, *b*), в группе НПН 100 мкМ было зафиксировано около 1% дегранулированных клеток ($n = 5$; рис. 4*a*(*c*, *b*), при увеличении концентрации НПН до 200 мкМ число дегранулированных клеток составило $3.6 \pm 1.7\%$ ($n = 4$; рис. 4*a*(*d*, *b*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение периферических механизмов мигрени имеет фундаментальное значение для разработки новых методов лечения, характеризующихся направленным действием непосредственно в место возникновения болевого сигнала. Твердая оболочка головного мозга, сосуды, множество чувствительных нервных окончаний тройничного нерва, а также тучные клетки формируют тригемино-васкулярную систему. Аfferенты тройничного нерва отвечают за сбор, анализ и обработку ноцицептивной информации от черепных структур, являются местом возникновения исходного болевого сигнала и могут быть потенциальной мишенью для терапевтического воздействия с целью профилактики и/или лечения мигрени [45–47]. Одной из эндогенных молекул, играющих ключевую роль в развитии мигрени, является NO, оказывающий сосудорасширяющие эффекты, что сопровождается выделением провоспалительных медиаторов в оболочках головного мозга, таких как гистамин, брадикинин, серотонин, CGRP, вещество P, нейрокинин A и простагландины, АТФ [48–51] и лежит в основе немедленной головной боли, вызванной донорами NO [52].

Согласно современным представлениям, NO может также непосредственно влиять на возбудимость нейрональных мембран, поэтому в нашей работе было проанализировано влияние экзогенного и эндогенного NO на частоту импульса-

ции афферентов тройничного нерва, увеличение которой можно соотнести с возникновением субъективного ощущения боли. Поэтому импульсацию тройничного нерва также называют ноцицептивной, а эффекты повышения частоты ПД тройничного нерва при действии альгогенов – проноцицептивными [53].

Для анализа эффектов эндогенно образующегося NO на возбудимость афферентов тройничного нерва использовали субстрат синтеза NO – L-аргинин, который дозозависимо повышал электрическую активность тройничного нерва, и этот эффект блокировался использованием ингибитора NO-синтазы L-NAME. Полученные данные позволяют предположить, что NO образуется эндогенно в области иннервации тройничного нерва и повышает возбудимость его афферентов. Действительно, в тригемино-васкулярной системе эндогенный NO может образовываться с помощью eNOS, экспрессирующейся в эндотелиальных клетках артерий твердой мозговой оболочки [54], и nNOS периваскулярных нервных волокон [55, 56]. Эндогенными стимулами для NOS являются провоспалительные цитокины, CGRP, активация НМДА-рецепторов, увеличение концентрации внутриклеточного кальция [8]. Ранее нами было показано наличие функциональных НМДА-рецепторов в нейронах тройничного ганглия, как в соме, так и в окончаниях тройничного нерва [57]. Активация НМДА-рецепторов во время приступа мигрени может способствовать усилению синтеза NO за счет притока Ca^{2+} . Кроме того, распространяющаяся корковая депрессия, являющаяся электрофизиологическим коррелятом мигрени с аурой, может способствовать выделению NO, вызывающему не только сосудистые, но и нейрональные эффекты [8, 58–60].

Участие эндогенного NO в патогенезе мигрени было подтверждено введением специфических ингибиторов NO-синтаз, которые показали свою эффективность во время лечения острого приступа мигрени [61–65]. L-NAME ослаблял CGRP-вызванную вазодилатацию [61], ингибировал как текущую активацию нейронов [64], так и вызванную экспрессию Fos-иммунореактивных белков в тригемино-цервикальном комплексе [66].

Экзогенный донор NO – НПН вызывал сходные с L-аргинином эффекты, вызывая повышение электрической активности тройничного нерва. Механизм высвобождения NO из НПН связан с взаимодействием с сульфгидрил-содержащими соединениями, такими как глутатион и цистеин. В результате этого взаимодействия происходит образование дисульфидных соединений, цианид-ионов и S-нитрозотиолов. S-нитрозотиолы *in vivo* являются хранилищем NO, из которых происходит его дальнейшее высвобождение посредством механизма переноса электронов, в который вовлечена тиоловая группа [67]. Инактивированный светом НПН не оказывал влияния на частоту ПД тройничного нерва, это указывает на то, что именно высвобождающийся NO как эффекторная молекула реализует свои эффекты при аппликации НПН.

Использование кластерного анализа позволило показать, что часть эффектов НПН опосредована активацией капсаицин-чувствительных C-волокон. Действительно, анализ распределения амплитуд ПД во времени показал, что 200 мкМ НПН приводил сначала к увеличению частоты ПД низкой амплитуды, которые распространяются с низкой скоростью в немиелинизированных C волокнах, затем наблюдалось появление высокоамплитудных ПД, распространяющихся быстрее, по-видимому, генерирующихся в A δ волокнах [68]. Кроме того, примерно половина волокон, отвечающих на НПН, также отвечала на аппликацию капсаицина, специфического агониста TRPV1-рецепторов, экспрессирующихся в пептидергических волокнах C-типа [41, 42].

Эффекты NO могут опосредоваться как цГМФ-зависимыми, так и цГМФ-независимыми механизмами [8]. В нашем исследовании эффекты НПН полностью предотвращались ингибитором гуанилатциклазы ODQ, что указывает на ведущую

роль гуанилатциклазы в эффектах НПН. Активация гуанилатциклазы приводит к синтезу цГМФ и активации протеинкиназы G [65, 69], которая через процессы фосфорилирования может влиять на активность ионных каналов, рецепторов и играет важную роль в гомеостазе Ca^{2+} . Основной мишенью PKG в нервных окончаниях являются Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой проводимости (BK-каналы) [70]. BK-каналы экспрессируются в связанных с мигренью структурах, таких как черепные артерии, тройничный ганглий, ядро тройничного нерва и играют существенную роль в регуляции тонуса сосудов и возбудимости нейронов [71]. Активация BK-каналов способствует поддержанию длительной нейрональной активности за счет уменьшения времени инактивации Na^+ -каналов. Конечным результатом является усиление входа Ca^{2+} , приводящее к высвобождению нейропептидов [70]. Кроме того, стимуляция растворимой гуанилатциклазы с помощью VL-102 непосредственно может повышать экспрессию и высвобождение CGRP из нейронов тройничного ганглия [72, 73]. Участие гуанилатциклазы в проноцицептивных эффектах подтверждается также исследованиями, в которых ODQ оказывал антиноцицептивные эффекты после интратекальной инъекции в моделях воспалительной и нейропатической боли [74–77].

Проноцицептивное действие NO может осуществляться и на уровне тучных клеток, локализующихся в твердой мозговой оболочке вблизи кровеносных сосудов и афферентов тройничного нерва как у людей [78, 79], так и у грызунов [80–82], образуя нейроиммунный синапс [29, 30, 43, 81]. В этой структуре активные вещества, выделяемые тучными клетками, могут активировать соседние ноцицептивные волокна, а соединения, высвобождаемые из активных волокон, в свою очередь, могут дегранулировать тучные клетки [83]. Недавно показано, что нитроглицерин при введении *in vivo* приводил к значительному увеличению дегрануляции тучных клеток [20, 84]. В нашей работе инкубация препарата в растворе, содержащем донор NO, не приводила к дегрануляции тучных клеток в оболочках головного мозга крысы, что согласуется с предыдущими исследованиями, где в условиях *ex vivo* экзогенные доноры NO не изменяли состояние тучных клеток [20]. По-видимому, при системном введении донора NO происходит выделение провоспалительных соединений (АТФ, CGRP, субстанции P) из эндотелиальных клеток сосудов и нервных окончаний, которые вызывают дегрануляцию тучных клеток [85, 88]. Поэтому в условиях *in vitro* требуется больше времени для реализации эффекта NO на тучные клетки.

Известно, что нитроглицерин имеет двухфазные эффекты: кратковременная вазодилатация, которая, по-видимому, опосредует головную боль непосредственно после инфузии, особенно ярко выраженную у пациентов с хронической мигренью [86]. У этих же пациентов впоследствии наблюдается головная боль через несколько часов после введения нитроглицерина [8, 87].

По-видимому, нейрональная активация при действии NO, которая была показана в нашем исследовании, приводит к выделению CGRP и АТФ, а также к усилению синтеза NO эндотелиальными клетками и его высвобождению в межклеточное пространство [52–54]. Увеличение концентрации NO и провоспалительных медиаторов (в частности АТФ, серотонин, CGRP) вызывает сенситизацию афферентов тройничного нерва [55, 56], что может лежать в основе длительных проноцицептивных эффектов введения нитроглицерина [92].

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что эндогенный и экзогенный донор NO оказывают проноцицептивное действие, вызывая активацию афферентов тройничного нерва крысы, увеличивая активность как пептидергических С-волокон, так и Аδ волокон, не изменяя состояния тучных клеток. Основной мишенью действия NO является растворимая гуанилатциклаза,

активация которой, как известно, может приводить к синтезу цГМФ и к усилению активности протеинкиназы G, способной фосфорилировать ионные каналы и рецепторы, а также к усилению высвобождения CGRP из пептидергических нервных окончаний. Полученные данные раскрывают нейрональные механизмы участия NO в патогенезе мигрени и обосновывают возможность использования блокаторов NO для купирования боли при остром приступе мигрени.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств РНФ № 21-75-00042 и гранта президента РФ № МК-4584.2022.1.4.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Г.Ф.С., К.С.К.); сбор данных (С.О.С., Д.А.Н.); обработка данных (А.Д.Б., О.Ш.Г.); написание и редактирование манускрипта (Г.Ф.С., К.С.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hermann A, Sitdikova GF, Weiger TM* (2013) Gasotransmitters: Physiology and pathophysiology. *Gasotransmitters Physiol Pathophysiol* 1–204. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30338-8>
2. *Ситдикова ГФ, Яковлев АВ, Герасимова ОВ, Яковлева ОВ* (2014) Газообразные посредники – оксид азота, монооксид углерода и сероводород – как новый класс сигнальных молекул межклеточных коммуникаций. В кн: Избранные главы фундаментальной и трансляционной медицины. Ред Жданов РИ Казань. Изд-во Казанск универ. 97–112. [*Sitdikova GF, Yakovlev AV, Gerasimova OV, Yakovleva OV* (2014) Gaseous mediators – nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide – as a new class of signaling molecules of intercellular communications. In book: Selected Chapters of Fundamental and Translational Medicine. Zhdanov RI (ed) Kazan. Kazan Univer Press. 97–112. (In Russ)].
3. *Кузнецова ВЛ, Соловьева АГ* (2015) Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия. Современные проблемы науки и образования 4: 462–462. [*Kuznetsova VL, Solovieva AG* (2015) Nitric oxide: properties, biological role, mechanisms of action. *Modern Problems Science Education* 4: 462–462. (In Russ)].
4. *Метельская ВА, Гуманова НГ* (2005) Оксид азота: роль в регуляции биологических функций, методы определения в крови человека. *Лаб мед* 7: 19–24. [*Metelskaya VA, Gumanova NG* (2005) Nitric oxide: role in the regulation of biological functions, methods of determination in human blood. *Lab Med* 7: 19–24. (In Russ)].
5. *Львова ОА, Орлова АЕ, Гусев ВВ, Ковтун ОП, Чегодаев ДА* (2010) К вопросу о роли оксида азота в норме и при патологии нервной системы. Системная интеграция в здравоохранении 4: 20–35. [*Lvova OA, Orlova AE, Gusev VV, Kovtun OP, Chegodaev DA* (2010) To the question of the role of nitric oxide in normal and pathological conditions of the nervous system. *System Integrat Healthcare* 4: 20–35. (In Russ)].
6. *Moncada S, Higgs EA* (2006) Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 176: 213–254. https://doi.org/10.1007/3-540-32967-6_7
7. *Chachlaki K, Garthwaite J, Prevot V* (2017) The gentle art of saying NO: How nitric oxide gets things done in the hypothalamus. *Nat Rev Endocrinol* 13: 521–535. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.69>

8. *Pradhan AA, Bertels Z, Akerman S* (2018) Targeted Nitric Oxide Synthase Inhibitors for Migraine. *Neurotherapeutics* 15: 391–401.
<https://doi.org/10.1007/s13311-018-0614-7>
9. *Olesen J* (2010) Nitric Oxide-Related Drug Targets in Headache. *Neurotherapeutics* 7: 183–190.
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.03.006>
10. *Goadsby PJ* (2007) Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends Mol Med* 13: 39–44.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.11.005>
11. *Goadsby PJ* (2009) Pathophysiology of Migraine. *Neurol Clin* 27: 335–360.
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2008.11.012>
12. *Ashina M, Hansen JM, Á Dunga BO, Olesen J* (2017) Human models of migraine-short-Term pain for long-Term gain. *Nat Rev Neurol* 13: 713–724.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.137>
13. *Bryan NS, Bian K, Murad F* (2009) Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci* 14: 1–18.
<https://doi.org/10.2741/3228>
14. *Bonnet C, Hao J, Osorio N, Donnet A, Penalba V, Ruel J, Delmas P* (2019) Maladaptive activation of Nav1.9 channels by nitric oxide causes triptan-induced medication overuse headache. *Nat Commun* 10: 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12197-3>
15. *Bellamy J, Bowen EJ, Russo AF, Durham PL* (2006) Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons. *Eur J Neurosci* 23: 2057–2066.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04742.x>
16. *Capuano A, De Corato A, Lisi L, Tringali G, Navarra P, Dello Russo C* (2009) Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: Relevance for migraine pathology. *Mol Pain* 5: 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-43>
17. *Messlinger K, Lennerz JK, Eberhardt M, Fischer MJM* (2012) CGRP and NO in the trigeminal system: Mechanisms and role in headache generation. *Headache* 52: 1411–1427.
<https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2012.02212.x>
18. *Coleman JW* (2002) Nitric oxide: A regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* 129: 4–10.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01918.x>
19. *Forsythe P, Gilchrist M, Kulka M, Befus AD* (2001) Mast cells and nitric oxide: Control of production, mechanisms of response. *Int Immunopharmacol* 1: 1525–1541.
[https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00096-0)
20. *Pedersen SH, Ramachandran R, Amrutkar DV, Petersen S, Olesen J, Jansen-Olesen I* (2015) Mechanisms of glyceryl trinitrate provoked mast cell degranulation. *Cephalalgia* 35: 1287–1297.
<https://doi.org/10.1177/0333102415574846>
21. *Eberhardt M, Dux M, Namer B, Miljkovic J, Cordasic N, Will C, Kichko TI, De La Roche J, Fischer M, Suárez SA, Bikiel D, Dorsch K, Leffler A, Babes A, Lampert A, Lennerz JK, Jacobi J, Martí MA, Doctorovich F, Högestätt ED, Zygmunt PM, Ivanovic-Burmazovic I, Messlinger K, Reeh P, Filipovic MR* (2014) H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun* 5: 1–17.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5381>
22. *Dux M, Will C, Vogler B, Filipovic MR, Messlinger K* (2016) Meningeal blood flow is controlled by H₂S-NO crosstalk activating a HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Br J Pharmacol* 173: 431–445.
<https://doi.org/10.1111/bph.13164>
23. *Zhang X, Levy D, Kainz V, Nosedà R, Jakubowski M, Burstein R* (2011) Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol* 69: 855–865.
<https://doi.org/10.1002/ana.22329>
24. *Yam MF, Loh YC, Tan CS, Adam SK, Manan NA, Basir R* (2018) General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int J Mol Sci* 19.
<https://doi.org/10.3390/ijms19082164>
25. *Levy D, Strassman AM* (2004) Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. *J Neurophysiol* 92: 766–772.
<https://doi.org/10.1152/jn.00058.2004>
26. *Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K* (2019) Does inflammation have a role in migraine? *Nat Rev Neurol* 15: 483–490.
<https://doi.org/10.1038/s41582-019-0216-y>
27. *Undem BJ, Riccio MM, Weinreich D, Ellis JL, Myers AC* (1995) Neurophysiology of mast cell-nerve interactions in the airways. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 199–201.
<https://doi.org/10.1159/000236976>

28. Spanos C, Pang X, Ligris K, Letourneau R, Alferes L, Alexacos N, Sant GR, Theoharides TC (1997) Stress-induced bladder mast cell activation: Implications for interstitial cystitis. *J Urol* 157: 669–672.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)65247-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)65247-9)
29. Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A (2005) The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Rev* 49: 65–76.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.11.006>
30. Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM (2007) Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain* 130: 166–176.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.03.012>
31. Levy D (2009) Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells. *Curr Pain Headache Rep* 13: 237–240.
<https://doi.org/10.1007/s11916-009-0040-y>
32. Gilchrist M, McCauley SD, Befus AD (2004) Expression, localization, and regulation of NOS in human mast cell lines: Effects on leukotriene production. *Blood* 104: 462–469.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2990>
33. McCauley SD, Gilchrist M, Befus AD (2005) Nitric oxide: A major determinant of mast cell phenotype and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 11–14.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900003>
34. Forsythe P, Gilchrist M, Kulka M, Befus AD (2001) Mast cells and nitric oxide: Control of production, mechanisms of response. *Int Immunopharmacol* 1: 1525–1541.
[https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00096-0)
35. De Col R, Messlinger K, Carr RW (2012) Repetitive activity slows axonal conduction velocity and concomitantly increases mechanical activation threshold in single axons of the rat cranial dura. *J Physiol* 590: 725–736.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.220624>
36. Zakharov A, Vitale C, Kilinc E, Koroleva K, Fayuk D, Shelukhina I, Naumenko N, Skorinkin A, Khazipov R, Giniatullin R (2015) Hunting for origins of migraine pain: Cluster analysis of spontaneous and capsaicin-induced firing in meningeal trigeminal nerve fibers. *Front Cell Neurosci* 9: 287.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00287>
37. Shatillo A, Koroleva K, Giniatullina R, Naumenko N, Slastnikova AA, Aliev RR, Bart G, Atalay M, Gu C, Khazipov R, Davletov B, Grohn O, Giniatullin R (2013) Cortical spreading depression induces oxidative stress in the trigeminal nociceptive system. *Neuroscience* 253: 341–349.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.002>
38. Shimada A, Cairns BE, Vad N, Ulriksen K, Pedersen AML, Svensson P, Baad-Hansen L (2013) Headache and mechanical sensitization of human pericranial muscles after repeated intake of monosodium glutamate (MSG). *J Headache Pain* 14: 1–9.
<https://doi.org/10.1186/1129-2377-14-2>
39. Gusevnikova VV, Sukhorukova EG, Fedorova EA, Polevshchikov A V, Korzhevskii DE (2015) A Method for the Simultaneous Detection of Mast Cells and Nerve Terminals in the Thymus in Laboratory Mammals. *Neurosci Behav Physiol* 45: 371–374.
<https://doi.org/10.1007/s11055-015-0084-x>
40. Levy D (2010) Migraine pain and nociceptor activation – Where do we stand? *Headache* 50: 909–916.
<https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2010.01670.x>
41. Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203–210.
<https://doi.org/10.1038/35093019>
42. Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A (2011) Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10: 601–620.
<https://doi.org/10.1038/nrd3456>
43. Theoharides TC, Spanos C, Pang X, Alferes L, Ligris K, Letourneau R, Rozniecki JJ, Webster E, Chrousos GP (1995) Stress-induced intracranial mast cell degranulation: A corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology* 136: 5745–5750.
<https://doi.org/10.1210/endo.136.12.7588332>
44. Schemann M, Kugler EM, Buhner S, Eastwood C, Donovan J, Jiang W, Grundy D (2012) The Mast Cell Degranulator Compound 48/80 Directly Activates Neurons. *PLoS One* 7: e52104.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052104>
45. Bartsch T, Goadsby PJ (2002) Stimulation of the greater occipital nerve induces increased central excitability of dural afferent input. *Brain* 125: 1496–1509.
<https://doi.org/10.1093/brain/awf166>
46. Bove GM, Moskowitz MA (1997) Primary afferent neurons innervating guinea pig dura. *J Neurophysiol* 77: 299–308.
<https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.1.299>

47. *Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM* (1998) Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 79: 964–982.
<https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.2.964>
48. *Moskowitz MA* (1984) The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol* 16: 157–168.
<https://doi.org/10.1002/ana.410160202>
49. *Moskowitz MA, Macfarlane R* (1993) Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5: 159–177.
50. *Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA* (2002) Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8: 136–142.
<https://doi.org/10.1038/nm0202-136>
51. *Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Koçak E, Sen ZD, Dalkara T* (2013) Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science* (80) 339: 621.
<https://doi.org/10.1126/science.1231897>
52. *Thomsen LL* (1997) Investigations into the role of nitric oxide and the large intracranial arteries in migraine headache. *Cephalalgia* 17: 873–895.
<https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1997.1708873.x>
53. *Edvinsson L, Villalón CM, Maassenvandenbrink A* (2012) Basic mechanisms of migraine and its acute treatment. *Pharmacol Ther* 136: 319–333.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.011>
54. *Edvinsson L, Mulder H, Goadsby PJ, Uddman R* (1998) Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the trigeminal ganglion: Cerebral vasodilatation from trigeminal nerve stimulation involves mainly calcitonin gene-related peptide. *J Auton Nerv Syst* 70: 15–22.
[https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(98\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(98)00033-2)
55. *Toda N* (1993) Mediation by nitric oxide of neurally-induced human cerebral artery relaxation. *Experientia* 49: 51–53.
<https://doi.org/10.1007/BF01928789>
56. *Ayajiki K, Fujioka H, Okamura T, Toda N* (2001) Relatively selective neuronal nitric oxide synthase inhibition by 7-nitroindazole in monkey isolated cerebral arteries. *Eur J Pharmacol* 423: 179–183.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01068-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01068-8)
57. *Guerrero-Toro C, Koroleva K, Ermakova E, Gafurov O, Abushik P, Tavi P, Sitdikova G, Giniatul-lin R* (2022) Testing the Role of Glutamate NMDA Receptors in Peripheral Trigeminal Nociception Implicated in Migraine Pain. *Int J Mol Sci* 23: 1529.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031529>
58. *Colonna DM, Meng W, Deal DD, Busija DW* (1994) Nitric oxide promotes arteriolar dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Stroke*. <https://europepmc.org/article/med/7526490>. Accessed 17 Apr 2022
59. *Colonna DM, Meng W, Deal DD, Gowda M, Busija DW* (1997) Neuronal NO promotes cerebral cortical hyperemia during cortical spreading depression in rabbits. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 272.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.3.h1315>
60. *Meng W, Colonna DM, Tobin JR, Busija DW* (1995) Nitric oxide and prostaglandins interact to mediate arteriolar dilation during cortical spreading depression. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 269.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.1.h176>
61. *Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ* (2002) Nitric oxide synthase inhibitors can antagonize neurogenic and calcitonin gene-related peptide induced dilation of dural meningeal vessels. *Br J Pharmacol* 137: 62–68.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704842>
62. *Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Olesen J* (1997) Nitric oxide synthase inhibition in migraine. *Lancet* 349: 401–402.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80021-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80021-9)
63. *Ashina M, Lassen LH, Bendtsen L, Jensen R, Olesen J* (1999) Effect of inhibition of nitric oxide synthase on chronic tension-type headache: A randomised crossover trial. *Lancet* 353: 287–289.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)01079-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)01079-4)
64. *De Col R, Koulchitsky SV, Messlinger KB* (2003) Nitric oxide synthase inhibition lowers activity of neurons with meningeal input in the rat spinal trigeminal nucleus. *Neuroreport* 14: 229–232.
<https://doi.org/10.1097/00001756-200302100-00014>
65. *Olesen J* (2010) Nitric Oxide-Related Drug Targets in Headache. *Neurotherapeutics* 7: 183–190.
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.03.006>
66. *Hoskin KL, Bulmer DCE, Goadsby PJ* (1999) Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat after stimulation of the superior sagittal sinus is reduced by L-NAME. *Neurosci Lett* 266: 173–176.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00281-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00281-5)

67. *Grossi L, D'Angelo S* (2005) Sodium nitroprusside: Mechanism of NO release mediated by sulfhydryl-containing molecules. *J Med Chem* 48: 2622–2626.
<https://doi.org/10.1021/jm049857n>
68. *MacIver MB, Tanelian DL* (1993) Structural and functional specialization of A δ and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *J Neurosci* 13: 4511–4524.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-10-04511.1993>
69. *Neeb L, Reuter U* (2008) Nitric Oxide in Migraine. *CNS Neurol Disord – Drug Targets* 6: 258–264.
<https://doi.org/10.2174/187152707781387233>
70. *Klyachko VA, Ahern GP, Jackson MB* (2001) cGMP-mediated facilitation in nerve terminals by enhancement of the spike afterhyperpolarization. *Neuron* 31: 1015–1025.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00449-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00449-4)
71. *Al-Karagholi MAM, Ghanizada H, Waldorff Nielsen CA, Skandarioon C, Snellman J, Lopez-Lopez C, Hansen JM, Ashina M* (2021) Opening of BKCa channels causes migraine attacks: a new downstream target for the treatment of migraine. *Pain* 162: 2512–2520.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002238>
72. *Ben Aissa M, Tipton AF, Bertels Z, Gandhi R, Moye LS, Novack M, Bennett BM, Wang Y, Litosh V, Lee SH, Gaisina IN, Thatcher GRJ, Pradhan AA* (2018) Soluble guanylyl cyclase is a critical regulator of migraine-associated pain. *Cephalalgia* 38: 1471–1484.
<https://doi.org/10.1177/0333102417737778>
73. *Bertels Z, Pradhan AA* (2019) Emerging Treatment Targets for Migraine and Other Headaches. *Headache* 59: 50–65.
<https://doi.org/10.1111/head.13585>
74. *Ferreira J, Santos ARS, Calixto JB* (1999) The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 38: 835–842.
[https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00006-4)
75. *Kawamata T, Omote K* (1999) Activation of spinal N-methyl-D-aspartate receptors stimulates a nitric oxide/cyclic guanosine 3',5'-monophosphate/glutamate release cascade in nociceptive signaling. *Anesthesiology* 91: 1415–1424.
<https://doi.org/10.1097/00000542-199911000-00035>
76. *Tao YX, Johns RA* (2002) Activation and up-regulation of spinal cord nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase, after formalin injection into the rat hind paw. *Neuroscience* 112: 439–446.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00075-1)
77. *Song XJ, Wang ZB, Gan Q, Walters ET* (2006) cAMP and cGMP contribute to sensory neuron hyperexcitability and hyperalgesia in rats with dorsal root ganglia compression. *J Neurophysiol* 95: 479–492.
<https://doi.org/10.1152/jn.00503.2005>
78. *Artico M, Cavallotti C* (2001) Catecholaminergic and acetylcholine esterase containing nerves of cranial and spinal dura mater in humans and rodents. *Microsc Res Tech* 53: 212–220.
<https://doi.org/10.1002/jemt.1085>
79. *Varatharaj A, MacK J, Davidson JR, Gutnikov A, Squier W* (2012) Mast cells in the human dura: Effects of age and dural bleeding. *Child's Nerv Syst* 28: 541–545.
<https://doi.org/10.1007/s00381-012-1699-7>
80. *Dimlich RVW, Keller JT, Strauss TA, Fritts MJ* (1991) Linear arrays of homogenous mast cells in the dura mater of the rat. *J Neurocytol* 20: 485–503.
<https://doi.org/10.1007/BF01252276>
81. *Rozniecki JJ, Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Pang X, Theoharides TC* (1999) Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. *Brain Res* 849: 1–15.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01855-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01855-7)
82. *Strassman AM, Weissner W, Williams M, Ali S, Levy D* (2004) Axon Diameters and Intradural Trajectories of the Dural Innervation in the Rat. *J Comp Neurol* 473: 364–376.
<https://doi.org/10.1002/cne.20106>
83. *Dimitriadou V, Rouleau A, Trung Tuong MD, Newlands GJF, Miller HRP, Luffau G, Schwartz JC, Garbarg M* (1997) Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. *Neuroscience* 77: 829–839.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00488-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00488-5)
84. *Kilinc E, Tore F, Dagistan Y, Bugdayci G* (2020) Thymoquinone Inhibits Neurogenic Inflammation Underlying Migraine Through Modulation of Calcitonin Gene-Related Peptide Release and Stabilization of Meningeal Mast Cells in Glyceryltrinitrate-Induced Migraine Model in Rats. *Inflammation* 43: 264–273.
<https://doi.org/10.1007/s10753-019-01115-w>
85. *Ferrari LF, Levine JD, Green PG* (2016) Mechanisms mediating nitroglycerin-induced delayed-onset hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 317: 121–129.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.005>

86. Olesen J, Iversen HK, Thomsen L (1993) Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuro Report*. 4(8): 1027–1030.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199308000-00008>
87. *Headache Classification Committee of the International Headache Society*. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia*. 2013 Jul; 33(9): 629–808.
<https://doi.org/10.1177/0333102417738202>
88. Jacobs B, Dussor G (2016) Neurovascular contributions to migraine: Moving beyond vasodilation. *Neuroscience* 338: 130–144.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.012>
89. Li J, Vause C V, Durham PL (2008) Calcitonin gene-related peptide stimulation of nitric oxide synthesis and release from trigeminal ganglion glial cells. *Brain Res* 1196: 22–32.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.028>
90. Messlinger K, Russo AF (2019) Current understanding of trigeminal ganglion structure and function in headache. *Cephalalgia* 39: 1661–1674.
<https://doi.org/10.1177/0333102418786261>
91. Iyengar S, Johnson KW, Ossipov MH, Aurora SK (2019) CGRP and the Trigeminal System in Migraine. *Headache* 59: 659–681.
<https://doi.org/10.1111/head.13529>
92. Ashina M (2012) Vascular changes have a primary role in migraine. *Cephalalgia* 32 (5): 428–430.
<https://doi.org/10.1177/0333102412438978>

Effects of Nitric Oxide on the Electrical Activity of the Trigeminal Nerve and the Mast Cell Morphology of Rats

K. S. Koroleva^{a, *}, S. O. Svitko^a, D. A. Nurmieva^a, O. Sh. Gafurov^a,
A. D. Buglina^a, and G. F. Sitdikova^a

^aKazan Federal University, Kazan, Russia

*e-mail: k.s.koroleva@yandex.ru

Nitric oxide (NO) is a member of the family of gasotransmitters involved in the regulation of various biological processes. Nitroglycerin, an NO donor, is widely used to simulate migraine in both humans and animals. However, the role of peripheral neuronal structures in the effects of NO is practically not studied. The aim of the work was to reveal the effects of NO on the electrical activity of the trigeminal nerve and the state of mast cells in the meninges of the rat brain. We used the electrophysiological method of action potentials (APs) recording of the rat trigeminal nerve, which innervates the dura mater, in a rat hemiskull preparation. To analyze the electrical activity, we used the clustering method, which makes it possible to divide APs into groups with similar characteristics generated by individual fibers. Mast cell morphology was assessed by staining rat dura mater with toluidine blue. The NO synthesis substrate – L-arginine dose-dependently increased the electrical activity of the trigeminal nerve, and this effect was canceled by preliminary application of the NO synthesis inhibitor – L-NAME (100 μM). An exogenous NO donor, sodium nitroprusside (SNP 200 μM), caused an increase in the frequency of APs, while light-inactivated SNP had no effect on the frequency of APs. Cluster analysis revealed that SNP induced first an increase in the frequency of low-amplitude APs propagating at a low speed in C-type fibers responding to capsaicin; later the appearance of high-amplitude APs propagating in Aδ-fibers was observed. Soluble guanylate cyclase inhibitor – ODQ (10 μM) prevented SNP-induced increase in electrical activity. At the same time, incubation of the dura mater in SNP did not affect the morphology of mast cells. Our data suggest that both exogenous and endogenous NO increases the electrical activity of the trigeminal nerve by activating guanylate cyclase, contributing to the peripheral neuronal mechanisms of pain in migraine.

Keywords: nitric oxide, L-arginine, migraine, rat, trigeminal nerve, guanylate cyclase, mast cells

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ
И СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА НА ЦЕРЕБРАЛЬНУЮ
ЦИРКУЛЯЦИЮ У КРЫС, СОДЕРЖАЩИХСЯ
НА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЕ**

© 2022 г. И. Б. Соколова*

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия***E-mail: SokolovaIB@infran.ru*

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 13.05.2022 г.

Принята к публикации 15.05.2022 г.

Изучали изменения плотности сосудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры головного мозга, опосредованной ацетилхолином (ACh) дилатации пиальных артерий, тканевой перфузии и сатурации кислородом у крыс Sprague Dawley после формирования у них метаболических и гормональных нарушений, сходных с метаболическим синдромом (МС) и сахарным диабетом 2-го типа (СД2). Для этого крыс 2 мес. содержали на высокожировой диете, а затем части животных вводили низкую дозу стрептозотцина (35 мг/кг). Еще 1 мес. все животные получали корм с повышенным содержанием жира. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки оценивали количество сосудов на определенной площади поверхности сенсомоторной коры и реакции пиальных артерий на воздействие ACh (10^{-7} М). У тех же животных с помощью многофункционального лазерного диагностического комплекса ЛАКК-М измеряли тканевую перфузию и уровень насыщения кислородом (SO_2). Установлено, что потребление высокожирового корма на протяжении 3 мес. привело к формированию у крыс МС: повышению уровня глюкозы в крови, развитию инсулинорезистентности и значительному набору висцерального жира. У этих животных уменьшалась плотность сосудистой сети в пиальной оболочке в 1.3–1.4 раза относительно контрольной группы, число дилатирующихся на воздействие ACh пиальных артерий было меньше в 1.2–1.6 раз, уровень тканевой перфузии статистически значимо не изменялся, а SO_2 снижалось в среднем на 9%. У крыс с СД2 не произошло дальнейшего урежения сосудистой сети, но ACh-опосредованная дилатация была меньше в 1.6–2.3 раза относительно контрольной группы. Тканевая перфузия была снижена на 22%, а SO_2 на 6%. Изменения церебральной циркуляции начинаются при развитии МС. Развитие СД2 приводит к эндотелиальной дисфункции мозговых артерий: чем меньше диаметр сосуда, тем хуже дилататорная реакция на ACh. Запустевание сосудистого русла, нарушение реактивности церебральных артерий негативно сказывается на снабжении ткани мозга кислородом.

Ключевые слова: метаболический синдром, сахарный диабет 2-го типа, пиальные артерии, дисфункция эндотелия

DOI: 10.31857/S0869813922060085

Эксперты ВОЗ охарактеризовали метаболический синдром (МС) как пандемию XXI века. Расстройство пищевого поведения, связанного с повышенным потреблением больших объемов высококалорийной пищи – прямой путь к развитию эндо-

кринных заболеваний, в том числе и сахарного диабета 2-го типа (СД2). У более чем 20% пациентов с СД2 формируются цереброваскулярные патологии [1]. Высокий уровень сахара в крови, нарушение липидного обмена, инсулинорезистентность, окислительный стресс приводят к ишемическим и геморрагическим инсультам [2], а также к повреждению мелких церебральных сосудов и формированию лакунарных инсультов [3]. У пациентов с СД2 отмечают развитие эндотелиальной дисфункции [4], утолщение стенки и уменьшение просвета мозговых сосудов [5]. Для разработки новых лекарственных препаратов и подходов к лечению СД2 необходимы подробные исследования причин и механизмов цереброваскулярных патологий. Мы предлагаем использовать методику прижизненного изучения функционирования мозговых сосудов и изменений гемодинамики у крыс с МС и СД2.

Цель представленного исследования – дать комплексную оценку нарушениям церебральной циркуляции у крыс с МС и СД2. Для этого поставлены следующие экспериментальные задачи: 1. Определить изменение в плотности сосудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры при развитии МС и СД2. 2. Выявить у тех же экспериментальных животных развитие эндотелиальной дисфункции. 3. Выяснить, как отражается развитие МС и СД2 на показатель мозговой циркуляции – перфузию – и уровень сатурации кислородом в ткани сенсомоторной коры головного мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс Sprague Dawley ($n = 30$) из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятыми Европейской конвенцией 19.07.2014, и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

В начале работы возраст крыс составлял 3 месяца, масса тела 300–350 г. Изначально были сформированы 2 пула животных. Контрольные крысы (группа 1, $n = 10$) содержались в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и стандартному пищевому рациону. Крысы, у которых формировался метаболический синдром (МС) (группа 2, $n = 10$) и сахарный диабет 2-го типа (СД2) (группа 3, $n = 10$) в течение 2 месяцев содержались на высокожировой диете. Высокожировая диета включала в себя комбикорм (370 г/кг), жир свиной (313 г/кг), казеин (253 г/кг), витаминно-минеральную смесь (61 г/кг) – 58% жира, 25% белка, 17% углеводов от общего количества калорий [6, 7]. Через 2 месяца крысам из группы 3 внутрибрюшинно был введен панкреотоксичный препарат – стрептозотозин в низкой концентрации (35 мг/кг) (Sigma-Aldrich, США). Еще 1 месяц животные из групп 2 и 3 получали высокожировую диету. Раз в месяц у всех животных проводили забор крови из хвостовой вены для регистрации уровня глюкозы с помощью глюкометра Акку-Чек Актив (“Рош Диабетс Кеа ГМБХ”, Германия). Через 3 месяца крысы из всех 3 групп прошли тесты на инсулинорезистентность и толерантность к глюкозе [8, 9].

Все последующие хирургические и экспериментальные действия были проведены на наркотизированных (золетил (Virbac, Франция) (20 мг/кг) внутрибрюшинно) крысах; эвтаназия проведена путем введения увеличенной дозы наркоза. Перед началом эксперимента у крыс измеряли уровень глюкозы в крови из хвостовой вены, массу тела, рост от кончика носа до анального отверстия, обхват живота.

В теменной области черепа животного высверливали отверстие ($S \approx 1 \text{ см}^2$), твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9; NaHCO_3 15.5; MgCl_2 1.2; CaCl_2 2.5; NaH_2PO_4 1.2; глюкоза 11.5; pH 7.4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержался в медицинском водяном термостате (ТW-2, SIA “ELMI”, Латвия) при температуре 37°C . На протяжении всего эксперимента контролировали среднее артериальное давление (АД), показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне. Прямое измерение АД производили через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlusTM (Argon Critical Care Systems, Сингапур, <https://www.argonmedical.com>), подключенным к АЦП, входящему в состав микроконтроллера фирмы STMicroelectronics (США), выход которого был подключен к компьютеру через порт USB. Для работы устройства с компьютером в нашей лаборатории была разработана оригинальная программа визуализации значений АД. Расчет среднего АД в реальном времени производился программой по классической формуле: $P_{\text{cp}} = P_{\text{д}} + 1/3(P_{\text{с}} - P_{\text{д}})$, где P_{cp} – среднее артериальное давление (мм рт. ст.), $P_{\text{с}}$ – систолическое давление (мм рт. ст.), $P_{\text{д}}$ – диастолическое давление (мм рт. ст.).

Температуру тела животного поддерживали на уровне 38°C . Контроль за ректальной температурой осуществлялся с помощью лабораторного термометра ТТЖ-М, (ОАО “Стеклоприбор”, Украина).

Визуализацию пиальных артерий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (“Микромед”, Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scopetek, Китай) и персональный компьютер. На статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии “Photo M” (авторская разработка А. Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru) определяли количество артерий и общее количество микрососудов на определенной площади. Затем измеряли диаметры пиальных артерий. В ходе эксперимента у каждого животного было исследовано более 40 пиальных артерий. Диаметры артерий измеряли в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса и при орошении мозга раствором ацетилхолина (ACh) (10^{-7} М) (Sigma-Aldrich, США). Все исследованные пиальные артериальные микрососуды были разбиты на группы в соответствии с исходным диаметром: 60–80 мкм, 40–60 мкм, 20–40 мкм, менее 20 мкм. О результатах воздействия ACh судили по количеству расширившихся артериальных сосудов. Степень дилатации ΔD оценивали как разность между значениями диаметра после (D_2) и до (D_1) воздействия АХ относительно диаметра сосуда D_1 перед воздействием АХ, %: $\Delta D = (D_2 - D_1)/D_1 \times 100$. Изменения диаметра в покое не превышали $5.0 \pm 0.5\%$, поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

У тех же экспериментальных животных с помощью многофункционального лазерного диагностического комплекса ЛАКК-М (“ЛАЗМА”, Россия) измеряли перфузию (П) и уровень насыщения кислородом (SO_2) в ткани сенсомоторной коры головного мозга. Датчик прибора размещали в 3 точках на поверхности мозга с приблизительными координатами AP = 1, 2, 3 мм от брегмы; SD = 1.0 мм латерально от сагиттального шва. Прилагаемое к комплексу ЛАКК-М программное обеспечение автоматически рассчитывало среднюю величину показателя микроциркуляции – П (условные единицы) и методом оптической тканевой оксиметрии определяло SO_2 (%).

Таблица 1. Параметры экспериментальных животных

Параметр	Группа 1 Контроль	Группа 2 МС	Группа 3 СД2
Увеличение массы тела относительно исходной, %	23 ± 0.9	33 ± 2.4 * <i>p</i> ≤ 0.05	102 ± 13.7 ** <i>p</i> ≤ 0.001
Удельная масса висцерального жира, %	2.28 ± 0.25	4.41 ± 0.42 * <i>p</i> ≤ 0.05	5.32 ± 0.24 *** <i>p</i> ≤ 0.0001
Индекс массы тела	0.77 ± 0.01	0.74 ± 0.02	0.79 ± 0.02
Уровень глюкозы в крови, ммоль/л	5.6 ± 0.1	10.8 ± 0.8 ** <i>p</i> ≤ 0.001	16 ± 0.9 ** <i>p</i> ≤ 0.001
Среднее АД, мм рт. ст.	120.2 ± 2.2	125.7 ± 2 * <i>p</i> ≤ 0.05	128.5 ± 1.9 * <i>p</i> ≤ 0.05
Тест на толерантность к глюкозе*	100%	105%	201%
Тест на инсулинорезистентность*	100%	114%	323%

* Измеряли площадь под кривой “концентрация глюкозы—время (120 мин)”. Результат для группы 1 (контроль) принят за 100%. Для групп 2 и 3 показано увеличение площади относительно группы 1, выраженный в %.

Уровни отличия указаны относительно группы 1.

Показатель индекса массы тела (масса тела/рост²), который используется для диагностики МС у людей, оказался не информативен для крыс: потребление высококалорийной пищи у взрослых людей приводит к набору массы тела, но практически не отражается на их росте; у крыс при нахождении на высокожировой диете увеличивалась и масса и длина тела.

После эвтаназии у животных тщательно изымали висцеральный жир и определяли его массу. Висцеральная жировая ткань у грызунов включает в себя мезентериальную (располагается по ходу кишечника), забрюшинную (располагается за почками) и эпидидимальную (располагается вдоль семенников) жировую ткань [10].

Математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариантов в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим парным сравнением групп согласно критерию Тьюки. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% (*p* < 0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования показали, что потребление высокожирового корма на протяжении 3 мес. (группа 2) привело к достоверному относительно контрольной группы повышению уровня глюкозы в крови, развитию инсулинорезистентности и значительному набору висцерального жира (табл. 1). Формирование СД2 (группа 3) привело к подъему уровня глюкозы в среднем до 16 ± 0.9 ммоль/л, формированию у животных инсулинорезистентности и толерантности к глюкозе, набору жировой массы. АД у крыс с МС и СД2 находилось в пределах нормы.

У крыс с МС (группа 2) было выявлено статистически значимое понижение плотности сосудистой сети в пиальной оболочке сенсомоторной коры (в среднем в 1.3 раза) и уменьшение количества артериальных сосудов на единицу площади измерения (в среднем в 1.4 раза). Практически такое же урежение сосудистого русла было выявлено и в группе 3 (СД2) (рис. 1).

Формирование МС привело к статистически значимому уменьшению числа пиальных артериальных сосудов, ответивших увеличением диаметра на воздействие

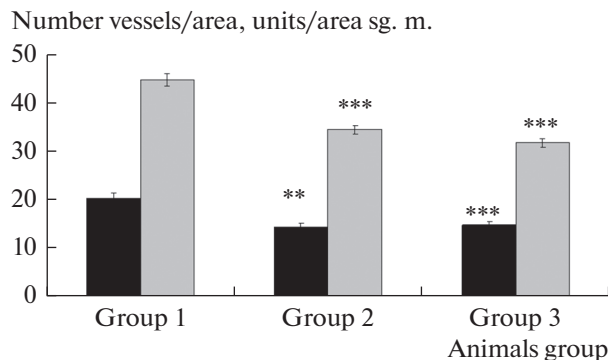


Рис. 1. Показатель плотности микрососудистого русла у крыс интактных (группа 1), с метаболическим синдромом (группа 2) и сахарным диабетом 2-го типа (группа 3). Темная заливка – число пиальных артерий/площадь измерения (мкм^2); светлая заливка – число всех сосудов/ площадь измерения (мкм^2). По оси абсцисс – группы экспериментальных животных; по оси ординат – показатель плотности микрососудистого русла. Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, критерий Тьюки).

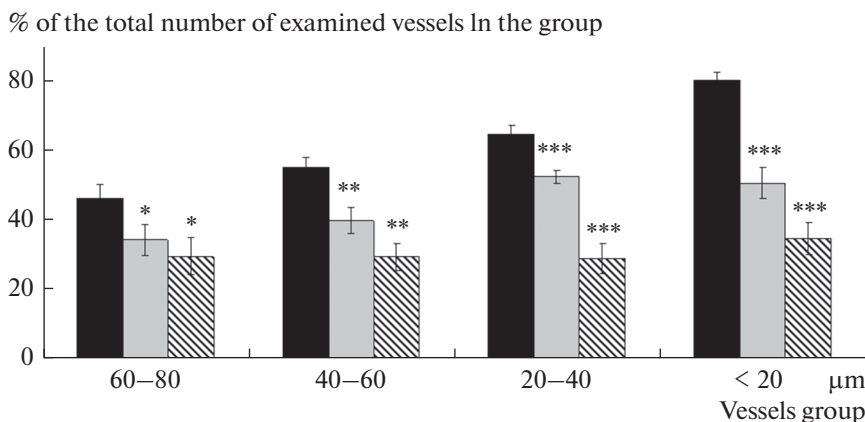


Рис. 2. Дилататорная реакция пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие ACh: — число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов). Темная заливка – контрольные животные (группа 1); светлая заливка – животные с МС (группа 2), штриховка – животные с СД2 (группа 3). По оси абсцисс – группы сосудов разного диаметра (мкм); по оси ординат – число расширившихся на воздействие ACh артерий относительно общего числа сосудов в группе (%). Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, критерий Тьюки).

на поверхность мозга ACh (рис. 2) – в среднем в 1.2–1.6 раза в зависимости от диаметра сосудов. У крыс с СД2 количество дилатирующих на воздействие ACh артерий было значительно меньше, чем у контрольных животных (группа 1) (в среднем в 1.6–2.3 раза) и чем у крыс с МС (группа 2) (в среднем в 1.2–1.9 раза).

На рис. 3 показано уменьшение показателей тканевой перфузии (*a*) и тканевого насыщения кислородом SO_2 (*b*) в сенсомоторной коре головного мозга у крыс с СД2 относительно контрольной группы и животных с МС: высокожировая диета не вызвала статистически значимого понижения тканевой перфузии, тогда как

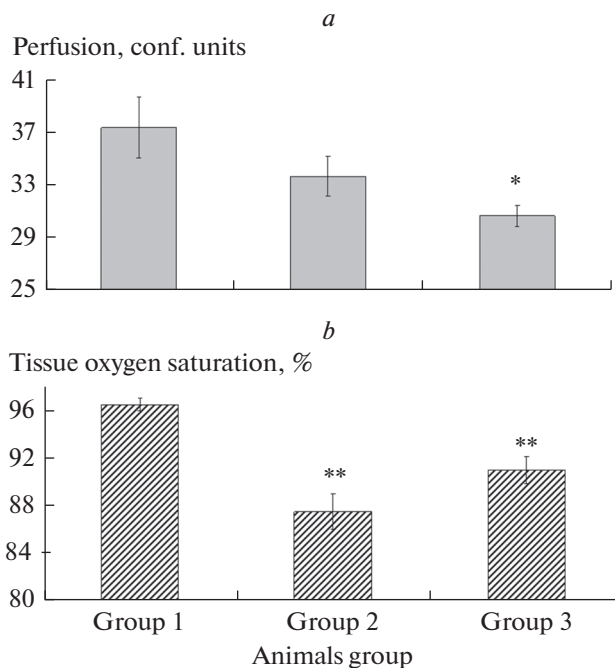


Рис. 3. Изменение уровня перфузии (*a*) и насыщенности кислородом (*b*) в ткани сенсомоторной коры головного мозга у крыс с метаболическим синдромом и сахарным диабетом 2-го типа. По оси абсцисс – группы экспериментальных животных; по оси ординат: *a* – показатель перфузии (усл. ед.), *b* – показатель тканевой насыщенности кислородом SO_2 (%). Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (** $p < 0.01$, критерий Тьюки).

развитие СД2 приводило к понижению этого показателя в среднем на 22%. Тканевое SO_2 было снижено и у животных с МС и с СД2 на 6–9%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование показало, что потребление пищи с повышенным содержанием жира в течение 3 мес. привело к развитию нарушений в регуляции метаболизма, формированию у животных патологических процессов, сходных по своим проявлениям с МС у человека и значимому ухудшению циркуляции в сенсомоторной коре головного мозга крыс по сравнению с интактными животными. У крыс с МС было выявлено урежение сосудистой сети пиальной оболочки (рис. 1). Применение стрептозотоцина и развитие СД2 на фоне высокожировой диеты не повлияло на архитектонику сосудистого русла пиальной оболочки сенсомоторной коры. В настоящее время считается, что повреждение стенки сосудов, в том числе и церебральных, происходит из-за избытка инсулина в тканях организма на фоне инсулинорезистентности, характерной как для МС, так и для СД2 [11]. Избыточный инсулин активирует митогенактивируемую протеинкиназу, которая, в свою очередь, стимулирует выработку различных ростовых факторов, запускающих пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток в стенке сосудов [12, 13], что значительно утолщает медию и уменьшает внутренний диаметр вплоть до полного стеноза. Однако в наших экспериментах инсулинорезистентность у крыс с МС имела место (табл. 1), но была гораздо менее выражена, чем при СД2. Вероятно, на ран-

них стадиях МС и СД2 за деградацию церебрального сосудистого русла отвечают и другие механизмы. МС характеризуется сочетанием висцерального ожирения с нарушением липидного обмена. Экспериментально показано, что повышение секреции липопротеинов очень низкой плотности в висцеральной жировой ткани способствует накоплению бета-амилоида в головном мозге [14]. Наличие агрегированного бета-амилоида в мелких церебральных сосудах выводит их из системы циркуляции крови, развивается церебральная амилоидная ангиопатия.

Развитие МС и СД2 привело к угнетению АСh-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов (рис. 2). Следует отметить, что у крыс с СД2 была нарушена закономерность: чем меньше диаметры сосудов, тем большее их число расширяется при воздействии АСh. Так, в норме разница между артериями 60–80 мкм и артериями менее 20 мкм по данному показателю составляла 1.7 раза, тогда как при СД2 мелкие артерии реагировали примерно так же, как крупные. У крыс с МС эта закономерность сохранялась: число дилатирующих мелких артерий превышало такое у самых крупных в 1.5 раза. Полученные данные подтверждают, что при СД2 в церебральных артериях происходит повреждение клеток интимы и развивается эндотелиальная дисфункция [3]. При этом в большей мере страдают мелкие артерии, т. е. наиболее вовлеченное в кислородный обмен звено сосудистой сети. Но эндотелиальную дисфункцию наблюдали и у животных с МС. В этом случае одну из ведущих ролей в развитии эндотелиальной дисфункции играет нарушение липидного обмена. Избыточное накопление насыщенных жирных кислот вызывает секрецию провоспалительных факторов IL-1 β , TNF- α , IL-6 [15, 16], снижение экспрессии белков плотных контактов и нарушение целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [17]. Повышение проницаемости ГЭБ способствует проникновению в мозг различных токсических метаболитов, провоспалительных факторов, иммунных клеток, активации микроглии, запуская развитие воспалительных процессов в церебральных структурах, в том числе и в стенке сосудов [18]. МС и СД2 оказывают негативное влияние и на перфузию и на сатурацию кислородом в сенсомоторной коре головного мозга экспериментальных животных (рис. 3). Уровень тканевой перфузии был статистически понижен только в группе СД2, тогда как уровень SO₂ был достоверно ниже нормы и при МС и при СД2. Понижение скорости мозгового кровотока было отмечено в экспериментальных [19] и клинических [2] исследованиях. Эти изменения у пациентов с СД2 связывают с нарушением ауторегуляции мозгового кровотока [20].

Итак, в представленной работе показано, что моделирование МС у крыс сопровождается урежением сосудистой сети пиальной оболочки головного мозга, развитием эндотелиальной дисфункции пиальных артерий и ухудшением их АСh-опосредованной дилатации, понижением тканевого насыщения кислородом. Эти изменения церебральной циркуляции развиваются при нормальном АД (125.7 \pm 2 мм рт. ст.) и умеренной гипергликемии (10.8 \pm 0.8 ммоль/л). Вероятно, каскад реакций, приводящих к мозговым патологиям, запускается накоплением висцерального жира. Повышение уровня глюкозы в крови животных с СД2 приводит к прогрессированию эндотелиальной дисфункции, особенно у артерий малого диаметра. Запустевание сосудистого русла, нарушение реактивности церебральных артерий негативно сказывается на снабжении ткани мозга кислородом – уровень сатурации у животных с СД2 был понижен на 6–9% по сравнению с контрольными животными.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источник финансирования – госбюджет. Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47_110_ДРиОК, раздел 64.1)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование статьи (И.Б.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou H, Xie P, Dong Y, Chen W, Wu H, Jiang Y, Lei H., Luo G, Liu J (2022) Lacunes and type 2 diabetes mellitus have a joint effect on cognitive impairment: a retrospective study. *Peer J* 3(10): e13069.
<https://doi.org/10.7717/peerj.13069>
2. Sloten T, Sedaghat S, Carnethon M, Launer L, Stehouwer C (2020) Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: storr, cognitive dysfunction, and depression. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8(4): 325–336.
[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30405-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30405-X)
3. Madonna R, Balistreri C, Geng Y, Caterina R (2017) Diabetic microangiopathy: pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascular Pharmacol* 90: 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.01.004>
4. Sun D, Wang J, Toan S, Muid D, Li R, Chang X, Zhou H (2022) Molecular mechanisms of coronary microvascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus: focus on mitochondrial quality surveillance. *Angiogenesis* 18.
<https://doi.org/10.1007/s10456-022-09835-8>
5. Демидов ВИ, Конкина ЕА, Майорова МВ (2008) Патоморфология микроциркуляторного русла перинфарктных зон головного мозга при сахарном диабете. *Вестник Ивановск мед акад* 13(1–2): 10–16. [Demidov VI, Konkina EA, Mayorova MV (2008) Pathological morphology of microcirculatory channel of brain perinfarction zones in diabetes mellitus. *Bull Ivanovo Med Acad* 13(1–2): 10–16. (In Russ)].
6. Кайдаш ОА, Иванов ВВ, Венгеровский АИ, Буйко ЕЕ, Щенеткин ИА (2020) Экспериментальная модель сахарного диабета 2-го типа у крыс, вызванная диетой с высоким содержанием жиров и стрептозоточином в низкой дозе. *Бюл сибирск мед* 19(2): 41–47. [Kaydash OA, Ivanov VV, Vengerovsky AI, Buiyko EE, Schepetkin IA (2020) The experimental model of type 2 diabetes mellitus caused by a high-fat diet with low-dose streptozotocin in rats. *Bull Siber Med* 19(2): 41–47. (In Russ)].
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-41-47>
7. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul C, Ramarao P (2005) Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 52: 313–320.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.05.004>
8. Gancheva S, Zhelyazkova–Savova M, Galunska B, Chervenkov T (2015) Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scripta Scient Med* 47(2): 23–30.
<https://doi.org/10.14748/ssm.v47i2.1145>
9. Dupas J, Feray A, Goanvec C, Guernec A, Samson N, Bougaran P, Guerrero F, Mansourati J (2017) Metabolic syndrome and hypertension resulting from fructose enriched diet in Wistar rats. *Biomed Res Int* 2017: 2494067.
<https://doi.org/10.1155/2017/2494067>
10. Якимов ИЮ, Бородин ДА, Подрезов ИК, Иванов ВВ, Васильев ВН, Котловский М Ю, Борисов ЛВ, Мильто ИВ (2015) Морфометрические параметры белой жировой ткани разной локализации у крыс при высокожировой диете. *Соврем пробл науки и образов* 5. [Yakimovich IY, Borodin DA, Podrezov IK, Ivanov VV, Vasilyev VN, Kotlovsky MY, Borisova LV, Milto IV (2015). White adipose tissue morphometric characteristics in hi-fat diet rats. *Modern problems of science and education* 5. (In Russ)].
11. Haratz S, Tanne D (2011) Diabetes, hyperglycemia and the management of cerebrovascular disease. *Current Opin Neurol* 24(1): 81–88.
<https://doi.org/10.1097/WCO.0bo13e3283418fed>
12. Ding Y, Vaziri N, Coulson R, Kamanna V, Roh D (2000) Effects of stimulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(1): E11–E17.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.1.E11>
13. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal M, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli L, Sesti G, Lauro R (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells.

- Circulation 106(4): 466–472.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000023043.02648.51>
14. *Arshad N, Lin T, Yahaya M* (2018) Metabolic syndrome and its effect on the brain: possible mechanism. *CNS Neurol Disord Drug Targeta* 17(8): 595–603.
<https://doi.org/10.2174/1871527317666180724143258>
 15. *Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson C, Smith U* (2007) Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(11): 2276–2283.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147835>
 16. *Jais A, Bruning J* (2017) Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 127(1): 24–32.
<https://doi.org/10.1172/JCI88878>
 17. *Dyken P, Lacoste B* (2018) Impact of metabolic syndrome on neuroinflammation and the blood-brain barrier. *Front Neurosci* 12: 930.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00930>
 18. *Schonfeld P, Reiser G* (2021) How the brain fights fatty acids' toxicity. *Neurochem Int* 148: 105050.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105050>
 19. *Li Y, Li Q, Pan C, Yan L, Hu B, Liu Y, Yang L, Huang P, Zhao S, Wang C, Fan J, Wang X, Han J* (2018) Bushen huoxue attenuates diabetes-induced cognitive impairment by improvement of cerebral microcirculation: involvement of Rho/ROCK/moesin and Src signaling pathways. *Front Physiol* 15(9): 527.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00527>
 20. *Wang S, Jiao F, Border J, Fang X, Crumpler R, Liu Y, Zhang H, Jefferson J, Guo Y, Elliott P, Thomas K, Strong L, Urvina A, Zheng B, Rijal A, Smith S, Yu H, Roman R, Fan F* (2022) Lu-seogliflozin, a sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor, reverses cerebrovascular dysfunction and cognitive impairments in 18-month-old diabetic animals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 322(2): H246–H259.

Effect of Metabolic Disorders and Streptozotocin Diabetes on Cerebral Circulation in Rats on a High-Fat Diet

I. B. Sokolova*

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

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

We studied changes of the density of the vasculature of the pial membrane of the sensorimotor cortex, of the acetylcholine (ACh)-mediated dilatation of the pial arteries, and of the tissue perfusion and oxygen saturation in Sprague Dawley rats after the formation of metabolic and hormonal disorders similar to metabolic syndrome (MS) and type 2 diabetes mellitus (DM2). The rats were kept on a high-fat diet for 2 months, and then a part of the animal group were administered with low dose streptozotocin (35mg/kg). All animals were fed with high-fat diet, for another one month. Using intravital microscopy we estimated the number of vessels on a certain surface area of the sensorimotor cortex and the reaction of the pial arteries to ACh (10^{-7} M). Tissue perfusion (P) and oxygen saturation (SO_2) were measured on the same animals using a multifunctional laser diagnostic complex LAKK-M. It was found that the consumption of high-fat food for 3 months led to the development of MS in rats, i.e. to an increase in the blood level of glucose, a development of insulin resistance, and a significant visceral fat gain. The density of the vascular network in the pial membrane of experimental rats decreased by 1.3–1.4 times relatively to the control group, the number of pial arteries dilating in response to ACh decreased by 1.2–1.6 times, the level of tissue perfusion was not statistically significant changed, and SO_2 decreased by an average of 9%. Further exhaustion of the vasculature did not occur in rats with T2D, but ACh-mediated dilatation decreased by 1.6–2.3 times relatively to the control group. P was reduced by 22% and SO_2 by 6%. Changes in cerebral circulation begin in course of the development of MS. The development of T2D leads to endothelial dysfunction of the cerebral arteries: the less vessel diameter, the worse the dilation in response to ACh. Desolation of the vascular bed, and impairment of the reactivity of the cerebral arteries adversely affects the supply of brain tissue with oxygen.

Keywords: metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, pial arteries, endothelial dysfunction

АНАЛИЗ РОЛИ D₁- И D₂-РЕЦЕПТОРОВ ДОФАМИНА В МОДУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ ОСМОТИЧЕСКОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВАЗОПРЕССИНА В КРОВИ

© 2022 г. П. Д. Правикова¹, *, Л. Н. Иванова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: PollyPravi@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2022 г.

После доработки 28.04.2022 г.

Принята к публикации 15.05.2022 г.

Исследована роль D₁- и D₂-подобных рецепторов дофамина в модуляции концентрирующей функции почек на крысах линии WAG и вазопрессин-дефицитных особях линии Brattleboro. Установлено, что блокада D₁-рецепторов (D₁R) при введении селективного антагониста SCH-23390 гидрохлорида не вызывает существенных изменений параметров гидруреза у крыс линии WAG, в то время как у крыс Brattleboro приводит к развитию антидиуретической реакции. Блокада D₂-рецепторов (D₂R) сульпиридом у крыс WAG сопровождается антидиуретическим ответом вследствие снижения скорости клубочковой фильтрации, тогда как у крыс Brattleboro снижение скорости мочеотделения происходило в связи с увеличением реабсорбции воды. Введение селективного антагониста D₁R, устраняющего активирующее влияние D₁R на цАМФ-систему, приводит к изменениям параметров натрийуретической функции, направленность которых зависит от уровня эндогенного вазопрессина в крови. У крыс WAG при блокаде D₁R установлено снижение скорости экскреции натрия, тогда как у вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro, напротив, выявлена натрийуретическая реакция вследствие торможения реабсорбции натрия. В то же время при введении сульпирида, стимулирующего активность аденилатциклазной системы вследствие подавления ингибирующего влияния D₂R на цАМФ, фиксируется антинатрийуретическая реакция у крыс обеих линий вне зависимости от уровня эндогенного вазопрессина в крови. Результаты исследований обсуждаются в контексте литературных данных и позволяют прийти к выводу о прямом вазопрессин-независимом эффекте подавления реабсорбции воды как D₁, так и D₂ подтипами рецепторов дофамина. Вместе с тем в условиях врожденной неспособности к синтезу эндогенного вазопрессина установлено активирующее влияние D₁R на транспорт натрия, тогда как тормозящий эффект D₂R на натрийуретическую функцию проявляется независимо от уровня гормона в крови и базальной активности цАМФ-системы.

Ключевые слова: дофамин, D₁-, D₂-рецепторы дофамина, вазопрессин, линии крыс WAG и Brattleboro, осморегулирующая функция почек

DOI: 10.31857/S0869813922060061

В системе осморегуляции у млекопитающих основным фактором, определяющим интенсивность реабсорбции воды в почке, является нейрогипофизарный гормон вазопрессин (ВП), классический сигнальный путь действия которого в эпителии собирательных трубок представлен цАМФ-сигнальным внутриклеточным каскадом [1]. Известно, что ВП способен оказывать стимулирующий или ингибирующий эффект на транспорт воды и натрия в эпителии почечных канальцев в зависимости от во-

влечения рецепторов V_2 - или V_{1a} -типа, активация которых определяется концентрацией гормона в крови [2].

В последние годы при изучении механизмов модуляции осморегулирующего эффекта ВП значительное внимание уделяется роли местных, аутоагонных факторов, выделение которых стимулирует сам гормон, формируя отрицательную обратную связь [3]. Поскольку система локальных факторов в почке является по сути механизмом саморегуляции и защиты эпителия, исследование механизмов аутокринно-паракринных взаимодействий имеет значительные научно-практические перспективы. К числу аутокринных факторов почки относится дофамин (DA), играющий значительную роль в регуляции как водно-электролитного баланса, так и кровяного давления [4, 5]. Рецепторы DA распределены гетерогенно вдоль нефрона [6] и подразделяются на два класса – D_1 -подобные рецепторы (подтипы D_{1R} и D_{5R}) и D_2 -подобные рецепторы (подтипы D_{2R} , D_{3R} и D_{4R}) [7, 8]. Аналогично трансдукции сигнала при действии ВП [9] ключевым посредником стимуляции DA является цАМФ-сигнальный путь: D_1 -подобные рецепторы сопряжены с G_s белком, активирующим аденилатциклазу [10], тогда как в условиях действия D_2 -подобных рецепторов, стимулирующих $G_{i/o}$ белок, активность цАМФ-сигнального каскада подавляется [8, 11]. Учитывая, что ключевым вторичным посредником трансдукции сигналов как ВП, так и DA является цАМФ, следует ожидать влияние DA, модулятора осморегулирующего эффекта ВП, на параметры почечной функции, реализующиеся посредством изменения активности цАМФ-системы. Кроме того, принимая во внимание особенности трансдукции сигнала различными подтипами рецепторов DA, можно предположить, что его действие на функцию осмотического концентрирования должно быть различным в зависимости от типа стимулируемого рецептора. Настоящее исследование было предпринято с целью выявления роли рецепторов DA, относящихся к разным классам, в модуляции параметров концентрирующей функции почек у крыс с различным уровнем ВП в крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использованы крысы в возрасте 60 дней и массой тела 150–200 г из вивария конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН, содержавшиеся в условиях стандартного рациона со свободным доступом к питьевой воде и сухому корму. Эксперименты проведены на крысах инбредной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) с высоким уровнем ВП в крови и на гомозиготных крысах линии Brattleboro, лишенных ВП вследствие мутации гена, кодирующего предшественник гормона [12]. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003), а также с учетом международных рекомендаций по работе с экспериментальными животными.

Животные каждой линии были разделены на 3 экспериментальные группы (по 9 особей в каждой): 1) контрольная группа; 2) крысы в условиях селективной блокады D_1 -рецепторов; 3) крысы в условиях блокады D_2 -рецепторов. Для блокады D_1 -рецепторов использован селективный антагонист R(+)-SCH-23390 гидрохлорид (R(+)-7-хлоро-8-гидрокси-3-метил-1-фенил-2,3,4,5-тетрагидро-1H-3-бензазепин гидрохлорид, Sigma, США) в дозе 0.1 мг/0.1 мл/100 г вводился внутривентрально дважды в течение суток (утро/вечер) [13]. Блокада D_2 -рецепторов осуществлялась в условиях внутривентрального введения селективного антагониста D_2R сульпирида (Sulpiride, (±)-N-(1-этил-2-пирролидинилметил)-2-метокси-5-сульфамойлбензамид, Sigma, США), в дозе 0.6 мг/0.1 мл/100 г дважды в течение 3.5 ч [14]. Контрольным особям двух линий вводился физиологический раствор в объеме 0.1 мл/100 г массы тела.

Через 60 мин после последней инъекции животных высаживали на 1 ч в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно экскретируемой мочи. По окончании эксперимента животных анестезировали тиопенталом натрия (10 мг/100 г массы тела, внутривенно) и забирали пробы крови.

Осмоляльность мочи и сыворотки крови измеряли криоскопическим методом (миллиосмометр ОСКР-1М КИВИ, Россия). Концентрацию креатинина в моче и сыворотке крови определяли методом Яффе на спектрофотометре (BioPhotometr plus, Erpendorf, Германия, 490 нм), скорость клубочковой фильтрации рассчитывали по клиренсу эндогенного креатинина. Содержание катионов натрия в пробах мочи и сыворотке крови измеряли методом пламенной фотометрии (Flame photometer 410 Sherwood, Великобритания). По стандартным формулам рассчитывали клиренс осмотически активных веществ (Cосм), максимальную реабсорбцию осмотически свободной воды ($T_{H_2O}^C$), экскрецию натрия (E_{Na}) и экскретируемую фракцию натрия (FE_{Na}). Все параметры рассчитывали по стандартным формулам на 100 г массы тела.

Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий оценивали в программе Statistica 8.0 с помощью апостериорного LSD критерия Фишера для множественных сравнений. Для парного сравнения средних между линиями применялся критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящем исследовании в соответствии с поставленной целью были оценены параметры, характеризующие гидруретическую и натрийуретическую функции у крыс, обладающих разной способностью к синтезу эндогенного ВП, в условиях блокады как D₁-, так и D₂-рецепторов DA.

У контрольных крыс линии WAG зарегистрирована низкая скорость мочеотделения и положительные значения показателей реабсорбции осмотически свободной воды, отражающие нормальный уровень эндогенного ВП. В то же время для выявления ВП-независимой роли D₁R и D₂R в регуляции осмотического концентрирования была предпринята серия экспериментов на крысах линии Brattleboro с наследственным дефицитом эндогенного ВП. Гидруретическая функция у контрольных крыс линий WAG и крыс Brattleboro, содержащихся на стандартном водно-пищевом рационе, существенно различалась. У ВП-дефицитных крыс Brattleboro фиксировалась высокая скорость диуреза и отрицательные показатели реабсорбции воды (рис. 1).

У крыс линии WAG в условиях блокады D₁R при введении SCH-23390 гидрохлорида не было выявлено существенных изменений параметров гидруреза (рис. 1), тогда как при введении антагониста D₂R сульпирида установлено снижение скорости мочеотделения на фоне уменьшения скорости клубочковой фильтрации (рис. 2) при сохранении базального уровня реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 1). Между тем, независимо от степени сродства к D₁R или к D₂R антагонистов, у ВП-дефицитных крыс Brattleboro развивалась антидиуретическая реакция, при этом снижение скорости мочеотделения вследствие активации реабсорбции осмотически свободной воды и снижения скорости клубочковой фильтрации (рис. 2) было более выраженным при блокаде D₂R (рис. 1). Введение сульпирида способствовало снижению скорости клубочковой фильтрации как у крыс WAG, так и Brattleboro, тогда как при блокаде D₁R SCH23390 гидрохлоридом не было выявлено достоверных изменений скорости клубочковой фильтрации у крыс обеих линий (рис. 2).

Контрольные показатели натрийуретической функции не имели существенных межлинейных различий (рис. 3). У крыс WAG с высоким уровнем эндогенного ВП

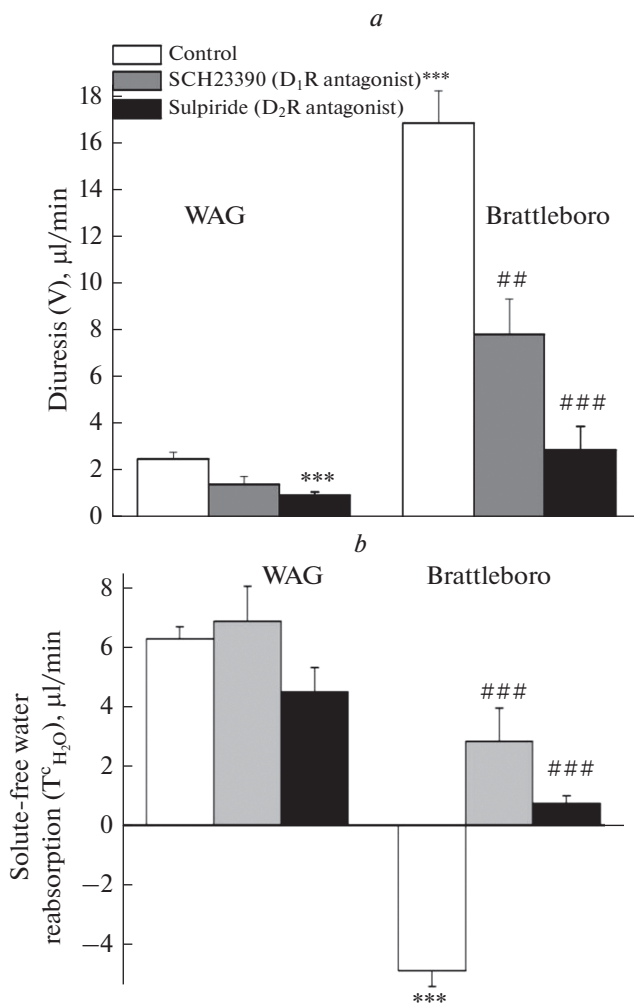


Рис. 1. Параметры гидруретической функции почек в условиях блокады как D₁R SCH23390 гидрохлоридом, так и D₂R сульпиридом у крыс линий WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$). *a* – скорость мочеотделения (V); *b* – реабсорбция осмотически свободной воды ($T_{H_2O}^C$). Достоверность различий: *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс линии WAG; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

в крови блокада подтипов рецепторов как D₁R, так и D₂R приводила к развитию антинатрийуретической реакции. Введение SCH23390 гидрохлорида, блокирующего действие D₁R, способствовало снижению скорости экскреции натрия на фоне отсутствия достоверных изменений уровня экскретируемой фракции (рис. 3). В то же время при введении антагониста D₂R сульпирида крысам WAG антинатрийуретический ответ был более выражен: наблюдалось существенное снижение клиренса осмотически активных веществ вследствие снижения скорости экскреции и экскретируемой фракции натрия (рис. 3). Между тем, у ВП-дефицитных крыс Brattleboro направленность изменений натрийуретической функции зависела от

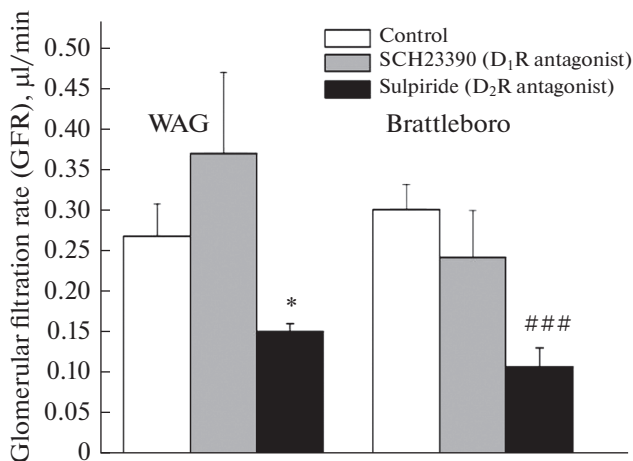


Рис. 2. Скорость клубочковой фильтрации (GFR) в условиях блокады как D₁R SCH23390 гидрохлоридом, так и D₂R сульпиридом у крыс линий WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$). Достоверность различий: * $p < 0.05$ – сравнение с контрольными показателями крыс линии WAG; ### $p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

селективности антагониста рецепторов DA: при устранении действия D₁R был зафиксирован рост осмотического очищения при усилении экскреции натрия вследствие торможения его реабсорбции, в то время как при введении сульпирида, блокирующего D₂R, напротив, был установлен антинатрийурез (рис. 3). Таким образом, селективная блокада D₁R приводила к изменению параметров натрийуретической функции, направленность которой определялась уровнем эндогенного ВП в крови, поскольку у ВП-дефицитных крыс Brattleboro, в отличие от особей WAG, была выявлена натрийуретическая реакция – увеличение экскретируемой фракции и скорости экскреции натрия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку паракринная система почки активируется при повышенной нагрузке, почечные аутоакоиды нередко рассматриваются в качестве протективных факторов, предотвращающих повреждение путем подавления транспортных процессов в эпителиоцитах почки [3]. Ранее дофаминергическая система почки характеризовалась диуретическим и натрийуретическим эффектом, а также в качестве сосудорасширяющего фактора [4, 5]. Вместе с тем, учитывая особенности трансдукции сигнала DA-рецепторов [8, 10], а также их распределение в почечной ткани [6], представляло интерес оценить роль рецепторов DA, относящихся к разным классам, как в ВП-независимой регуляции концентрирующей функции почки, так и в модуляции осморегулирующего эффекта ВП.

Независимо от врожденной способности к синтезу эндогенного ВП, у крыс при блокаде D₁R SCH23390 гидрохлоридом, снижающего активность цАМФ-сигнального каскада [10, 13], не было выявлено достоверных изменений скорости клубочковой фильтрации, поскольку, как известно, в клубочке почек D₁R не локализованы [7]. Кроме того, согласно ранее полученным данным, блокада D₁R приводила к снижению скорости клубочковой фильтрации только на фоне высокосолевого диет, в то время как при нормальном потреблении натрия скорость клубочковой фильтрации оставалась неизменной [15]. В то же время блокада D₂-рецепторов сульпиридом способствовала выраженному снижению скорости клубочковой

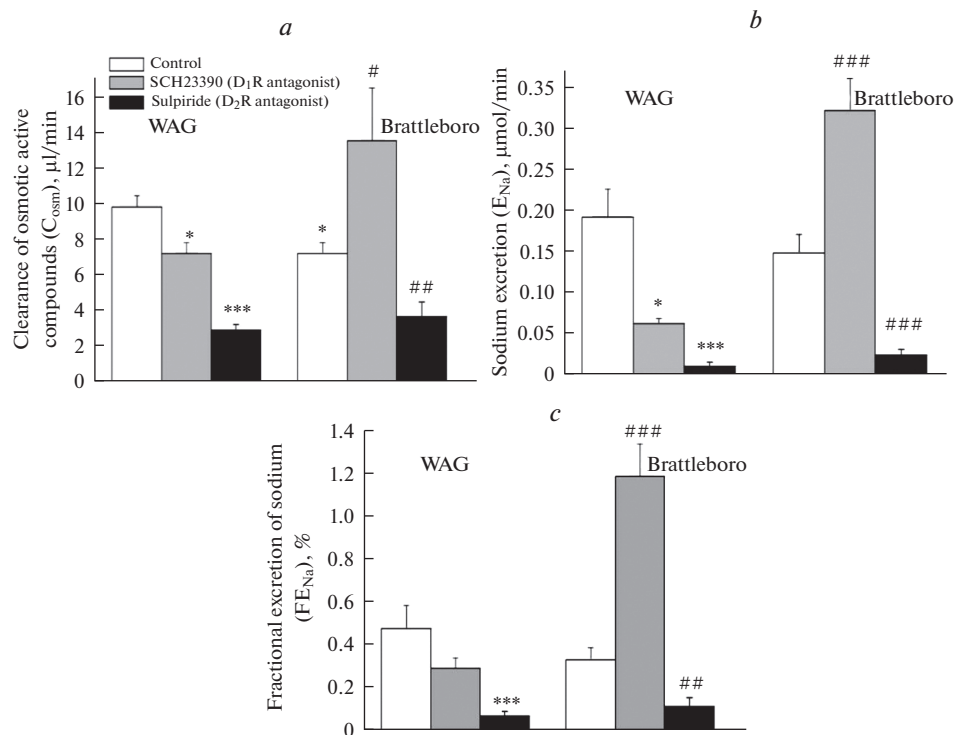


Рис. 3. Параметры натрийуретической функции в условиях блокады как D₁R SCH23390 гидрохлоридом, так и D₂R сульпиридом у крыс линий WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$). *a* – осмоляльное очищение ($C_{осм}$); *b* – скорость экскреции натрия (E_{Na}); *c* – экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}). Достоверность различий: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс WAG; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

филтрации у крыс обеих линий, что является следствием устранения сосудорасширяющего эффекта D₂-рецепторов [16] и способствует снижению скорости мочеотделения. Предполагается, что применение сульпирида, устраняющее блокирующее влияние D₂R на аденилатциклазу [14], может явиться новым терапевтическим подходом при лечении клубочковой гиперфилтрации [17]. Сохранение уровня скорости клубочковой филтрации на прежнем уровне у крыс WAG при блокаде D₁R сопровождалось отсутствием достоверных изменений показателей гидруретической функции, в то время как введение антагониста D₂R способствовало развитию антидиуреза вследствие снижения скорости филтрации без существенных изменений реабсорбции воды. Отсутствие изменений показателя реабсорбции осмотически свободной воды у крыс WAG при блокаде как D₁R, так и D₂R объясняется, по всей видимости, преобладающим влиянием высокого уровня эндогенного ВП на факультативную реабсорбцию воды. На сегодняшний день не выявлено межлинейных различий дофаминергической системы почки у крыс линий WAG и Brattleboro, несмотря на зафиксированное ранее снижение уровня DA в лобной коре на фоне гиперфункции DA в полосатом теле у ВП-дефицитных особей Brattleboro [18, 19]. В то же время у ВП-дефицитных крыс Brattleboro при введении блокатора D₁R SCH-23390 гидрохлорида, а также в условиях применения антагониста D₂R сульпирида было зафиксировано снижение скорости мочеотделения, обусловленное

ВП-независимыми механизмами. Более выраженный антидиуретический ответ у крыс Brattleboro был выявлен в условиях введения сульпирида, который обусловлен увеличением реабсорбции осмотически свободной воды, а также снижением скорости клубочковой фильтрации. Кроме того, увеличение эффективности осмотического концентрирования у особей Brattleboro на фоне блокады D₂R, по-видимому, было в связи с увеличением внутривещного концентрационного градиента, поскольку при введении сульпирида был установлен антинатрийурез вследствие устранения ингибирующего влияния D₂R на реабсорбцию натрия в почечных канальцах. Между тем, у крыс Brattleboro в условиях блокады D₁R SCH-23390 на фоне отсутствия достоверных изменений скорости фильтрации при действии гидрохлорида было зафиксировано снижение скорости мочеотделения, обусловленное, в первую очередь, увеличением реабсорбции осмотически свободной воды. Блокада D₁R приводит к устранению стимулирующего влияния на цАМФ-систему, поскольку, известно, что D₁R сопряжены с G_s-белком, активирующим аденилатциклазу [10]. Между тем ранее предполагалось, что DA-индуцированный диурез и натрийурез опосредован стимуляцией D₁R, приводящей к стимуляции фосфолипидного сигнального каскада [20], способствующей, как известно, снижению водопроницаемости эпителия собирательных трубок [21]. Позднее было выявлено, что стимуляция альтернативного Ca-зависимого фосфолипидного сигнального пути является следствием синергизма D₁/D₂-рецепторов [22], обусловленного коэкспрессией D₁R и D₂R в собирательных трубках [16, 23]. Вместе с тем, принимая во внимание, что ВП-дефицитные крысы Brattleboro характеризуются сниженной активностью всех изоформ аденилатциклазы [24], можно предположить, что трансдукция сигнала D₁R идет по альтернативному фосфолипидному пути, блокада которого приводит к устранению его тормозящего влияния на реабсорбцию воды.

Как известно, основной физиологический эффект DA при модуляции функции осмотического концентрирования – увеличение натрийуреза вследствие подавления реабсорбции натрия в эпителии почечных канальцев [4]. Независимо от степени средства антагонистов к D₁R или к D₂R у крыс WAG был зафиксирована антинатрийуретическая реакция, которая была более выражена при блокаде D₂R. Известно, что стимуляция D₁R подавляет экспрессию Na⁺/H⁺-обменника (NHE3), а также активность Na⁺,K⁺-АТФазы в эпителиоцитах как проксимального канальца, так и толстого восходящего колена петли Генле [25–27]. В то же время зафиксированное у крыс WAG сохранение начального уровня экскретируемой фракции натрия несмотря на снижение скорости его экскреции при введении антагониста D₁R, очевидно, явилось следствием сохранения преобладающего эффекта ВП на натрийуретическую функцию почек в собирательных трубках и дистальных сегментах нефрона [2]. Вместе с тем при введении крысам обеих линий сульпирида, приводящего, напротив, к прекращению подавляющего действия D₂R на цАМФ-сигнальный путь, антинатрийуретический ответ был обусловлен активацией реабсорбции натрия, по-видимому, в проксимальных частях нефрона, что подтверждается ранее полученными данными [28]. Установленное влияние блокады D₂R на реабсорбцию натрия не зависит от уровня эндогенного ВП и обусловлено устранением D₂R-опосредованного натрийуретического эффекта в проксимальных канальцах нефрона [29]. Кроме того, предполагается, что установленный антинатрийурез у крыс WAG при введении сульпирида является, в том числе, следствием нивелирования блокирующего влияния DA на ВП-зависимую реабсорбцию натрия в кортикальной части собирательных трубок [30]. Между тем, в отличие от односторонней межлинейной реакции при устранении D₂R, эффект блокады D₁R зависел от уровня ВП в крови. У ВП-дефицитных крыс Brattleboro, в противоположность особям WAG, была зафиксирована натрийуретическая реакция в ответ на

введение антагониста D₁R SCH-23390. У крыс Brattleboro зафиксированное торможение транспорта натрия при введении блокатора D₁R SCH23390 гидрохлорида является по сути прямым компенсаторным эффектом устранения стимулирующего действия D₁R на цАМФ-систему при сниженной базальной активности аденилатциклазы [24]. Кроме того, обсуждая особенности почечной дофаминергической системы и связанных с ней факторов, важно упомянуть о семействе ферментов циклооксигеназ (ЦОГ). Известно, что натрийуретическая дофаминергическая система по механизму обратной связи подавляет синтез ЦОГ-1,2, которые, в свою очередь, приводят к стимуляции реабсорбции натрия посредством активации ренин-ангиотензиновой системы [31]. В то же время ранее было установлено, что у крыс Brattleboro обнаруживается снижение уровня экспрессии ЦОГ-1,2 во всех зонах почки [32], что, вероятно, является причиной развития натрийуретической реакции на фоне блокады D₁R при отсутствии стимулирующего влияния ЦОГ-системы на транспорт натрия.

Таким образом, вне зависимости от типа блокируемого рецептора DA был выявлен ВП-независимый антидиуретический ответ вследствие устранения прямого ингибирующего влияния как D₁R, так и D₂R на реабсорбцию воды. Кроме того, результаты исследования позволяют прийти к выводу о стимулирующем эффекте D₁R на транспорт натрия на фоне врожденного дефицита эндогенного ВП, тогда как влияние D₂R, подавляющего уровень цАМФ, направлено на торможение реабсорбции натрия и не зависит от уровня ВП в крови и базальной активности цАМФ-системы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-04-00298 А), а также за счет средств бюджетного финансирования по государственному заданию № FWNR-2022-0007.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Л.Н.И.), планирование эксперимента (Л.Н.И., П.Д.П.), сбор данных (П.Д.П.), обработка данных (П.Д.П.), написание манускрипта (Л.Н.И., П.Д.П.), редактирование манускрипта (Л.Н.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tamma G, Robben JH, Trimpert C, Boone M, Deen PM* (2011) Regulation of AQP2 localization by S256 and S261 phosphorylation and ubiquitination. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: 636–646. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00433.2009>. Epub 2010 Dec 9. PMID: 21148409
2. *Bankir L, Bichet DG, Bouby N* (2010) Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *Am J Physiol Renal Physiol* 299(5): F917–F928. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00413.2010>
3. *Leipziger J, Praetorius H* (2020) Renal Autocrine and Paracrine Signaling: A Story of Self-protection. *Physiol Rev* 100(3): 1229–1289. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2019>
4. *Armando I, Villar VAM, Jose PA* (2011) Dopamine and renal function and blood pressure regulation. *Compr Physiol* 1: 1075–1117. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100032>
5. *Cuevas S, Villar VA, Jose PA, Armando I* (2013) Renal dopamine receptors, oxidative stress and hypertension. *Int J Mol Sci* 14: 17553–17572. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8106>
6. *Olivares-Hernández A, Figuero-Pérez L, Cruz-Hernandez JJ, González Sarmiento R, Usategui-Martin R, Miramontes-González JP* (2021) Dopamine Receptors and the Kidney: An Overview

- of Health- and Pharmacological-Targeted Implications. *Biomolecules*. 11(2): 254.
<https://doi.org/10.3390/biom11020254>
7. *Hussain T, Lokhandwala MF* (2003) Renal dopamine receptors and hypertension. *Exp Biol Med* (Maywood) 228: 134–142.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.32.2.187>
 8. *Zeng C, Armando I, Luo Y, Eisner GM, Felder RA, Jose PA* (2008) Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H551–H569.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01036.2007>
 9. *Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S* (2002) Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542: 3–16.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020818>
 10. *Shonesy BC, Stepheson JR, Marks CR, Colbran RJ* (2020) Cyclic AMP-dependent protein kinase and D1 dopamine receptors regulate diacylglycerol lipase- and synaptic 2-arachidonoyl glycerol signaling. *J Neurochem* 153: 334–345.
<https://doi.org/10.1111/jnc.14972>
 11. *Holmes A, Lachowicz JE, Sibley DR* (2004) Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. *Neuropharmacology* 47: 1117–1134.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.034>
 12. *Valtin H, Schroeder HA* (1997) Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro rat). 1964 [classical article]. *J Am Soc Nephrol* 8: 1333–1341.
<https://doi.org/10.1681/ASN.V881333>
 13. *Di Ciano LA, Azurmendi PJ, Colombero C, Levin G, Oddo EM, Arrizurieta EE, Nowicki S, Ibarra FR* (2015) Defective renal dopamine function and sodium-sensitive hypertension in adult ovariectomized Wistar rats: role of the cytochrome P-450 pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 308(12): F1358–F1368.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00450.2014>
 14. *Del Compare JA, Aguirre JA, Ibarra FR, Barontini M, Armando I* (2001) Effects of thyroid hormone on the renal dopaminergic system. *Endocrine* 15(3): 297–303.
<https://doi.org/10.1385/ENDO:15:3:297>
 15. *Ibarra ME, Albertoni Borghese MF, Majowicz MP, Ortiz MC, Loidl F, Rey-Funes M, Di Ciano LA, Ibarra FR* (2017) Concerted regulation of renal plasma flow and glomerular filtration rate by renal dopamine and NOS I in rats on high salt intake. *Physiol Rep* 5(6): e13202.
<https://doi.org/10.14814/phy2.13202>
 16. *Gao DQ, Canessa LM, Mouradian MM, Jose PA* (1994) Expression of the D2 subfamily of dopamine receptor genes in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 266: 646–650.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1994.266.4.F646>
 17. *Luippold G, Schneider S, Stefanescu A, Benöhr P, Mühlbauer B* (2001) Dopamine D2-like receptors and amino acid-induced glomerular hyperfiltration in humans. *Br J Clin Pharmacol* 51(5): 415–421.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2001.01373.x>
 18. *Shilling PD, Kinkead B, Murray T, Melendez G, Nemeroff CB, Feifel D* (2006) Upregulation of striatal dopamine-2 receptors in Brattleboro rats with prepulse inhibition deficits. *Biol Psychiatry* 60(11): 1278–1281.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.045>
 19. *Cilia J, Garlton JE, Shilliam C, Dawson LA, Moore SH, Jones DN* (2010) Further neurochemical and behavioural investigation of Brattleboro rats as a putative model of schizophrenia. *J Psychopharmacol* 24(3): 407–419.
<https://doi.org/10.1177/0269881108098787>
 20. *Lokhandwala MF, Amenta F* (1991) Anatomical distribution and function of dopamine receptors in the kidney. *FASEB J* 5(15): 3023–3030.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.5.15.1683844>
 21. *Ma F, Chen G, Rodriguez EL, Klein JD, Sands JM, Wang Y* (2020) Adrenomedullin Inhibits Osmotic Water Permeability in Rat Inner Medullary Collecting Ducts. *Cells* 9(12): 2533.
<https://doi.org/10.3390/cells9122533>
 22. *Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanca AJ, O'Dowd BF, George SR* (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 279: 35671–35678.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M401923200>
 23. *Ohbu K, Felder RA* (1991) DA1 dopamine receptors in renal cortical collecting duct. *Am J Physiol* 261: 890–895.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1991.261.5.F890>
 24. *Schen T, Suzuki Y, Poyard M, Miyamoto N., Defer N, Hanoune J.* (1997) Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the adult, in developing, and in the Brattleboro rat kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: 323–330.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.1.C323>

25. *Beaulieu JM, Gainetdinov RR* (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63: 182–217.
<https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
26. *Zeng C, Felder RA, Jose PA* (2006) A new approach for treatment of hypertension: modifying D1 dopamine receptor function. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 4: 369–377.
<https://doi.org/10.2174/187152506778520727>
27. *Wang T, Weinbaum S, Weinstein AM* (2017) Regulation of glomerulotubular balance: flow-activated proximal tubule function. *Pflugers Arch* 469(5–6): 643–654.
<https://doi.org/10.1007/s00424-017-1960-8>
28. *Smit AJ, Meijer S, Wesseling H, Donker AJ, Reitsma WD* (1990) Dissociation of renal vasodilator and natriuretic effects of dopamine during sulpiride infusion in normal man. *Eur J Clin Pharmacol* 39(3): 221–226.
<https://doi.org/10.1007/BF00315100>
29. *Ozono R, Ueda A, Oishi Y, Yano A, Kambe M, Katsuki M, Oshima T* (2003) Dopamine D2 receptor modulates sodium handling via local production of dopamine in the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* 42: S75–S79.
<https://doi.org/10.1097/00005344-200312001-00017>
30. *Edwards RM, Brooks DP* (2001) Dopamine inhibits vasopressin action in the rat inner medullary collecting duct via a2-adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1001–1006.
31. *Zhang MZ, Yao B, McKanna JA, Harris RC* (2004) Cross talk between the intrarenal dopaminergic and cyclooxygenase-2 systems. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(4): F840–F845.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00240.2004>
32. *Kotnik P, Nielsen J, Kwon TH, Krzysnik C, Frøkiaer J, Nielsen S* (2005) Altered expression of COX-1, COX-2, and mPGES in rats with nephrogenic and central diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(5): F1053–F1068.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00114.2004>

Analysis of Dopamine D₁- and D₂-Receptors Effect on Renal Osmoregulatory Function in Rats with Different Blood Vasopressin Level

P. D. Pravikova^a, * and L. N. Ivanova^a

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

**e-mail: PollyPravi@yandex.ru*

We studied the effect of D₁- and D₂-like dopamine receptors on the modulation of the renal osmoregulatory function in WAG and vasopressin-deficient Brattleboro rats. It was established that in WAG rats SCH-23390-induced blockade of D₁-receptors (D₁R) did not lead to changes in the renal hydruretic function, while in Brattleboro rats it promoted the development of antidiuretic response. Blockade of D₂-receptors (D₂R) by sulpiride in WAG rats is accompanied by an antidiuretic response due to the decrease in glomerular filtration rate, while in Brattleboro rats, a decrease in urinary flow rate occurred due to the increase in water reabsorption. The administration of a selective D₁R antagonist, which eliminates the activating effect of D₁R on the cAMP-system, lead to changes in the renal natriuretic function, the direction of which depended on the blood level of endogenous vasopressin (AVP). In WAG rats with D₁R blockade, a decrease in the sodium excretion rate was found, while in AVP-deficient Brattleboro rats, on the contrary, a natriuretic response was detected due to inhibition of sodium reabsorption. At the same time, the administration of sulpiride, which stimulates the cAMP-system due to the suppression of the inhibitory effect of D₂R on cAMP, results in an antinatriuretic reaction in rats of both lines, regardless of the AVP level. These results were discussed in the context of the literature data and allow us to conclude that there is a direct AVP-independent effect of the suppression of water reabsorption by both D₁- and D₂- dopamine receptor subtypes. At the same time, activating effect of D₁R on sodium transport in conditions of congenital AVP deficiency was established, while an inhibitory effect of D₂R on natriuretic function, regardless of the AVP level and the basal activity of the cAMP-system.

Keywords: dopamine, D₁-, D₂-dopamine receptors, vasopressin, WAG, Brattleboro, renal osmoregulatory function

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ В МОЗГЕ КРЫС
ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ
И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ
В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2022 г. А. П. Шварц^{1, *}, А. Д. Дёмина¹, М. В. Захарова¹, А. А. Коваленко¹,
М. О. Грязнова¹, А. М. Ищенко², А. В. Зайцев¹

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

²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: aleksandr.pavlovich.schwarz@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 12.05.2022 г.

Обратная транскрипция в сочетании с количественной (в реальном времени) полимеразной цепной реакцией (ОТ-кПЦР) является золотым стандартом для оценки экспрессии генов на уровне РНК, однако требует тщательного выбора валидных референсных генов для нормализации результатов. Целью данной работы было определение оптимальных референсных генов для ОТ-кПЦР экспериментов в височной коре и дорзальном гиппокампе мозга крыс в латентную фазу (период эпилептогенеза до появления спонтанных рецидивирующих судорог) литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне отдельного или сочетанного применения рекомбинантного провоспалительного цитокина – рецепторного антагониста интерлейкина-1 (100 мг/кг в сутки) и комбинации антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мкг/кг S-аденозилметионина). Была проанализирована экспрессия 9 референсных генов (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*). С помощью сервиса RefFinder® мы определили оптимальные референсные гены для оценки уровня содержания целевых мРНК в дорзальном гиппокампе (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*) и височной коре (*Pgk1*, *Sdha*, *Ppia*) головного мозга. При этом было выявлено значимое усиление экспрессии генов *Actb* и *B2m* в дорзальном гиппокампе, которое не подавлялось ни применением IL-1ra, ни смесью антиоксидантов, ни их сочетанием. Мы также оценили уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина интерлейкина-1 бета (*Il1b*) в дорзальном гиппокампе, нормируя его относительно трех оптимальных (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*) референсных генов либо относительно нестабильных *Actb* и *B2m*. В случае использования оптимальных референсных генов было обнаружено, что экспрессия гена *Il1b* увеличивается в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии, и ни один из видов терапии не изменяет этой реакции. При нормировке относительно уровня мРНК *Actb* и *B2m*, изменения экспрессии гена *Il1b* в дорзальном гиппокампе в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели не выявляются. Исходя из этого, гены *Actb* и *B2m* могут быть вовлечены в процесс эпилептогенеза и не могут использоваться в качестве референсных в эпилептических моделях. Таким образом, результаты нашей работы демонстрируют важность аккуратного выбора референсных генов.

Ключевые слова: ОТ-ПЦР, референсный ген, экспрессия генов, мРНК, височная эпилепсия, литий-пилокарпиновая модель, мозг

DOI: 10.31857/S0869813922060073

Обратная транскрипция в сочетании с количественной (в реальном времени) полимеразной цепной реакцией (ОТ-кПЦР) является золотым стандартом для оценки экспрессии генов на уровне РНК. Этот метод обладает рядом важных преимуществ, включая высокий уровень стандартизации, широкий динамический диапазон измерений, возможность оценки большого количества мишеней. Тем не менее, получение качественных данных требует соблюдения ряда условий при планировании, проведении, обработке и публикации результатов ОТ-кПЦР, которые легли в основу руководства MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments – минимальная информация для публикации экспериментов с применением количественной ПЦР) [1]. Кроме соблюдения всех требований к пробоподготовке и проведению реакции для количественной оценки экспрессии генов крайне важно затем правильно нормировать полученные данные.

На сегодняшний день стандартным подходом к нормированию данных ОТ-кПЦР является расчет содержания целевых мРНК относительно мРНК референсных генов [2]. Традиционно для таких целей использовались гены домашнего хозяйства, однако в последние десятилетия накапливаются свидетельства того, что их экспрессия может тоже изменяться в некоторых моделях, и поэтому разрабатываются подходы для поиска наиболее надежных референсных генов среди экспериментальных образцов [3–5]. Неудачный выбор референсных генов может привести к потере значимых различий или даже обнаружению противоположных реальным по знаку изменений экспрессии целевых РНК [6].

Ранее нами были определены оптимальные референсные гены для ОТ-кПЦР в пентилентетразоловой модели острых судорог, не приводящих к индукции эпилептогенеза [7]. Настоящая работа направлена на оценку стабильности наиболее часто используемых референсных генов в мозге крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии при применении экспериментальной терапии, направленной на подавление процессов нейровоспаления и окислительного стресса. Литий-пилокарпиновая модель считается одной из лучших моделей для изучения патогенеза приобретенной эпилепсии [8]. Процессы нейровоспаления и окислительного стресса, сопутствующие нейродегенеративным изменениям при эпилептогенезе, способны взаимно усиливать друг друга, и считаются перспективными мишенями для превентивной терапии приобретенных форм эпилепсии [9].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на самцах крыс Вистар, выращенных в экспериментально-биологической клинике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (ИЭФБ РАН). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Биоэтического комитета ИЭФБ РАН.

На начало эксперимента возраст животных составлял 6–8 нед. Индукцию пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса проводили, как подробно описано ранее [10]. За сутки до введения пилокарпина всем крысам, включая контрольных, внутрибрюшинно (в/б) вводили раствор хлорида лития в дозе 127 мг/кг (LiCl; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Для блокады периферических мускариновых рецепторов вводили бромид N-метилскополамина (1 мг/кг, в/б; Sigma-Aldrich) за час до введения пилокарпина. Пилокарпин (Sigma-Aldrich) вводили дробно в дозе 10–40 мг/кг (по 10 мг/кг с интервалом 30 мин, в/б) до развития судорог силой 4 балла по шкале Racine [11]. По истечении 75 мин после начала 4-й стадии судорог их блокировали введением диазепама (в/б, 10 мг/кг, Sigma-Aldrich). Животным контрольной группы вместо пилокарпина вводили физиологический раствор.

Экспериментальную терапию начинали через час после остановки эпилептического статуса и проводили в течение 7 дней. Части животных вводили человеческий рекомбинантный противовоспалительный цитокин – рекомбинантный рецепторный антагонист интерлейкина-1 (в/б, IL-1ra, препарат анакинра, Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия) в дозе 100 мг/кг (группа Li-PC + IL-1ra), другим – смесь антиоксидантов [12]: витамин С (ОАО “Дальхимфарм”, Хабаровск, Россия) в дозе 100 мг/кг, витамин Е (АО “Мосагроген”, Москва, Россия) в дозе 200 мг/кг, S-аденозилметионин (адеметионина бутандисульфат, препарат “Гептор”, АО “Верофарм”, Россия) в дозе 25 мг/кг (в/б); третьим вариантом терапии было комбинированное введение IL-1ra и смеси антиоксидантов (в/б).

Нелеченым животным после эпилептического статуса и контрольной группе (введение LiCl без пилокарпина) вводили физраствор и стерильное подсолнечное масло (растворитель для инъекционной формы витамина Е). Выбор терапии обусловлен показанным ранее нейропротекторным эффектом выбранной дозы IL-1ra в исследуемой модели эпилепсии [13], а также эффективным подавлением окислительного стресса при применении указанного сочетания низкомолекулярных антиоксидантов [12].

Через 7 дней после эпилептического статуса (одни сутки после последней инъекции препаратов) животных декапитировали, быстро извлекали мозг, замораживали и хранили мозг при -80°C до дальнейшей обработки. Дорзальную область гиппокампа и височную область коры больших полушарий выделяли с использованием микротомы-криостата, как было подробно описано ранее [7]. Границы начала и окончания извлечения областей мозга указаны на рис. 1.

РНК выделяли методом кислой гуанидин-изотиоцианат-хлороформной экстракции с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия). Образцы РНК подвергали обработке RQ1 ДНКазой, свободной от РНКаз, (Promega, США) в течение 15 мин с последующей преципитацией РНК в растворе хлорида лития (конечная концентрация около 6 М) и промывкой в 75%-ном этаноле. Концентрацию РНК определяли по поглощению раствора при длине волны 260 нм, а чистоту препарата – по соотношению оптической плотности при длинах волн 260/280 нм на спектрофотометре NanoDropLite (ThermoFisherScientific, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием 1 мкг выделенной РНК, 0.5 мкг oligodT- и 0.25 мкг случайных 9-мерных праймеров (ДНК-Синтез, Москва, Россия), 15 е. а. РНАзина (Силекс, Москва, Россия) и 100 е. а. MMLV-ревертазы (Евроген, Москва, Россия) при 42°C в течение часа с предварительным отжигом праймеров при 70°C в течение 10 мин (до добавления фермента). Реакцию останавливали прогреванием в течение 10 мин при 65°C , полученную кДНК разводили в 10 раз и хранили при -20°C перед ПЦР.

ПЦР в реальном времени для анализа экспрессии 9 референсных генов (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*, *Saha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) проводили с применением оригинальных мультиплексных тест-систем нашей разработки, как подробно описано ранее [14], с использованием TaqM-полимеразы (Алкор-био, Санкт-Петербург, Россия) на приборе CFX384 (Bio-Rad Laboratories, США) в конечном объеме реакции 5 мкл, внося по 0.7 мкл образцов кДНК в четырех повторностях, с использованием отрицательного контроля ПЦР (вода вместо кДНК) и отрицательного контроля обратной транскрипции (пробы, в которые во время проведения обратной транскрипции не добавляли ревертазы). Также дополнительно оценивали экспрессию гена провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β (*Il1b*). Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Праймеры были синтезированы компанией “ДНК-синтез” (Москва, Россия).

Стабильность референсных генов оценивали с помощью онлайн-сервиса RefFinder® [15], объединяющего в себе 4 популярных алгоритма оценки стабиль-

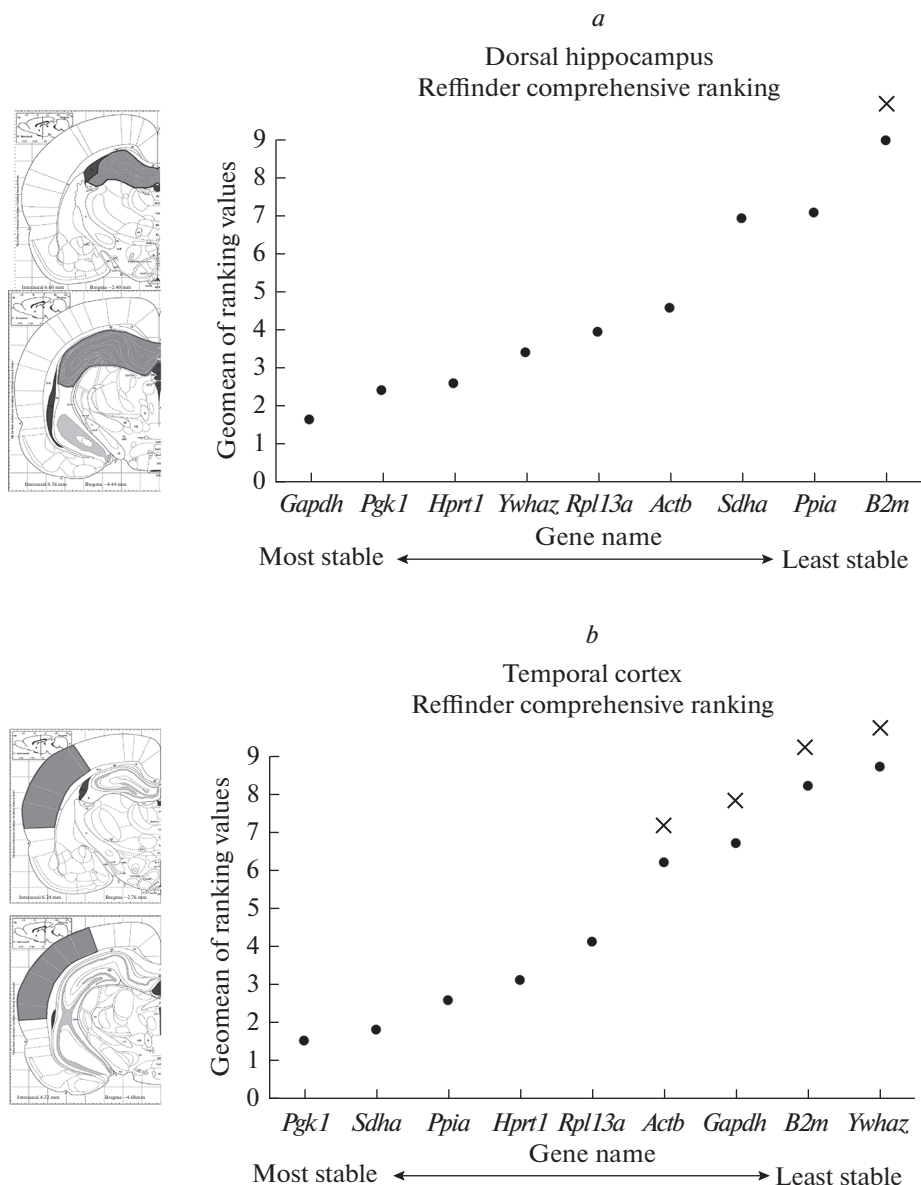


Рис. 1. Стабильность экспрессии референсных генов в дорзальном гиппокампе (*a*) и височной коре (*b*) головного мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне раздельной и комбинированной терапии рецепторным антагонистом IL-1ra (анакинра, 100 мг/кг) и смесью антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мг/кг S-аденозилметионина). Материал для анализа забирали через 7 дней после индукции эпилептического статуса, терапию начинали через час после остановки судорог. × – гены непригодные для использования в качестве референсных согласно алгоритму geNorm ($M > 0.5$), по оси ординат указан объединенный ранг стабильности гена, рассчитанный на основании геометрического усреднения рангов, рассчитанных 4 алгоритмами. Слева от графиков приведены условные границы начала (верхний рисунок) и окончания (нижний рисунок) забора материала для анализа согласно атласу крысиного мозга в стереотактических координатах [26] (дорзальный гиппокамп: Interaural 6.60...4.56 Bregma –2.40...–4.44; височная кора: Interaural 6.24...4.32 Bregma –2.76...–4.68).

Таблица 1. Праймеры и зонды для количественной ПЦР

Название гена Номер в базе данных RefSeq	Последовательность 5'-3' (прямой, обратный, зонд)	Ссылка на источник
<i>Gapdh</i> ¹ NM_017008	TGCACCACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTC ATCAGCCACAGCTTTCCAGAGGG*	[17]
<i>Ppia</i> ² NM_017101	AGGATTCATGTGCCAGGGTG CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA&	[18]
<i>B2m</i> ¹ NM_012512	TGCCATTTCAGAAAACCTCCCC GAGGAAGTTGGGCTTCCCATT ATTCAAGTGTACTCTCGCCATCCACCG&	[19]
<i>Actb</i> ¹ NM_031144	TGTCACCAACTGGGACGATA GGGGTGTGTAAGGTCTCAA CGTGTGGCCCCTGAGGAGCAC#	Прямой и обратный праймер – [20] зонд – [14]
<i>Ywhaz</i> ³ NM_013011	GATGAAGCCATTGCTGAACCTTG GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC&	Прямой и обратный праймер – [21] зонд – [14]
<i>Rpl13a</i> ² NM_173340	GGATCCCTCCACCCTATGACA CTGGTACTCCACCCGACCTC CTGCCCTCAAGGTTGTGCGGCT#	Прямой и обратный праймер – [22] зонд – [14]
<i>Pgk1</i> ³ NM_053291	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTT TGCTGGCTGGATGGGCTTGGGA*	Прямой и обратный праймер – [21] зонд [14]
<i>Hprt1</i> ³ NM_012583	TCCTCAGACCGCTTTTCCCGC TCATCATCACTAATCACGACGCTGG CCGACCGGTTCTGTCATGTCGACCCCT#	Прямой и обратный праймер – [23] зонд – [14]
<i>Sdha</i> ² NM_130428	AGACGTTTGACAGGGGAATG TCATCAATCCGCACCTTGTA ACCTGGTGGAGACGCTGGAGCT*	Прямой и обратный праймер – [24] зонд – [14]
<i>Il1b</i> NM_031512	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC TGTCGCCGACCATTGCTGTTTCCTAG #	[25]

* Мечены флуорофором R6G и гасителем флуоресценции BHQ2; # – мечены FAM и гасителем флуоресценции BHQ1 quencher; & – мечены флуорофором ROX и гасителем флуоресценции BHQ2; ^{1,2,3} – тест-системы с одинаковым индексом входят в состав одного мультиплекса.

ности: geNorm [3], Normfinder [15], BestKeeper [5], comparative Delta-Ct [4] и формирующего объединенный рейтинг стабильности на основании геометрического усреднения рангов каждого гена, полученного каждым из этих методов.

Экспрессию изучаемых генов рассчитывали относительно трех оптимальных референсных для конкретной области с помощью $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода [16]. Данные нормировали по среднему значению контрольной группы (инъекции LiCl) и логарифмировали по основанию 2, чтобы привести к нормальному распределению. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 7.00 с применением однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного попарного сравнения с применением критерия Даннета (в качестве группы сравнения использовались нелеченые животные после эпилептического статуса). Для поиска выпадающих значений применяли метод Грабба.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы оценили стабильность экспрессии 9 референсных генов, традиционно используемых для нормализации данных ОТ-кПЦР, в гиппокампе и височной коре головного мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височ-

ной эпилепсии на фоне отдельной или совместной терапии противовоспалительными (рецепторный антагонист IL-1) и антиоксидантными (витамин С, витамин Е, S-аденозилметионин) препаратами.

Согласно алгоритму geNorm, ориентируясь на критерий $M > 0.5$, в дорзальном гиппокампе 8 из 9 проанализированных генов, исключая только ген *B2m*, могут использоваться в качестве референсных (рис. 1а). Используя объединенный рейтинг стабильности на основании геометрического усреднения рангов каждого гена, полученного с помощью четырех методов, мы выявили, что наиболее стабильно экспрессируются гены *Gapdh*, *Pgk1* и *Hprt1*.

В височной коре экспрессия изученных генов в целом была менее стабильной (рис. 1б). Согласно алгоритму geNorm, четыре гена (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Ywhaz*) экспрессировались нестабильно и были непригодны для нормализации данных ОТ-кПЦР. По объединенному рейтингу наиболее стабильными референсными генами оказались *Pgk1*, *Sdha*, *Ppia*.

Мы рассчитали уровень экспрессии 6 изученных генов относительно трех оптимальных референсных генов для каждой изученной области (рис. 2 и 3).

В дорзальном гиппокампе обнаружено увеличение экспрессии генов *B2m* и *Actb* после эпилептического статуса, при этом ни один из исследованных видов терапии не подавлял этих изменений (рис. 2; *B2m*: $F(4,37) = 4.777$; $p < 0.01$ и *Actb*: $F(4,36) = 3.674$; $p = 0.01$). В височной области коры значимых изменений экспрессии генов обнаружено не было (рис. 3).

Чтобы оценить, как может повлиять на оценку экспрессии генов интересовавший нас выбор референсных генов, мы оценили экспрессию гена провоспалительного цитокина интерлейкина-1 бета (*Il1b*) в гиппокампе крыс, нормируя относительно уровня экспрессии каждого из трех наиболее стабильных референсных генов (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*), их геометрического среднего, или относительно двух самых нестабильных (*B2m* и *Actb*) (рис. 4). При использовании наиболее стабильных референсных генов было выявлено значимое повышение уровня экспрессии гена *Il1b* после эпилептического статуса (геометрическое среднее: $F(4,35) = 3.8$, $p = 0.01$; *Hprt1*: $F(4,35) = 4.3$, $p < 0.01$; *Pgk1*: $F(4,35) = 3.9$, $p = 0.01$; *Gapdh*: $F(4,35) = 3.3$, $p = 0.02$). В то же время при нормализации относительно экспрессии гена *B2m* или *Actb* изменений экспрессии не выявлялось (*B2m*: $F(4,34) = 0.52$, $p = 0.72$; *Actb*: $F(4,34) = 1.9$, $p = 0.13$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы изучили стабильность экспрессии 9 референсных генов в височной коре и гиппокампе крыс при экспериментальном эпилептогенезе – в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии – на фоне применения экспериментальной противовоспалительной (рецепторный антагонист IL-1), антиоксидантной (витамин С, витамин Е, S-аденозилметионин) терапии и их сочетания. Ранее подобных исследований с литий-пилокарпиновой моделью не проводилось, однако были работы с моделями электрической стимуляции перфорантного пути и каинатной моделью, а также с пилокарпиновой моделью без использования хлорида лития [27, 28]. В нашей недавней работе на пентилентетразоловой модели острых судорог мы показали, что выбор устойчивых референсных генов для гиппокампа и разных областей коры сильно различается, что воспроизвелось и в настоящем исследовании. Так, экспрессия гена *Gapdh* была наиболее стабильной в гиппокампе, в то время как в височной коре она не была стабильной (рис. 1). С другой стороны, стабильность экспрессии генов *Ppia* и *Sdha* была высокой в височной коре, но не в гиппокампе (рис. 1, 2).

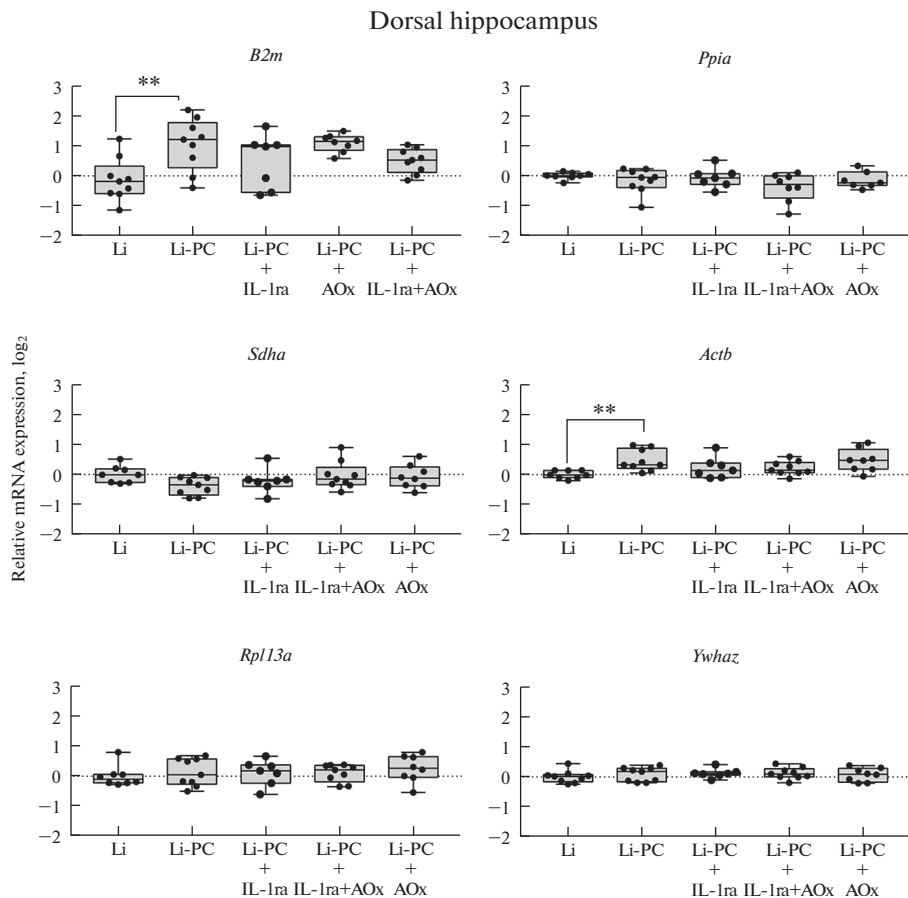


Рис. 2. Экспрессия референсных генов в дорзальном гиппокампе крыс в латентную фазу (7 дней после индукции) литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне раздельной и комбинированной терапии противовоспалительным цитокином IL-1ra и смесью антиоксидантов). Li – контрольные животные без индукции судорог (только введение хлорида лития), Li-PC – животные, у которых вызвали эпилептический статус путем введения пилокарпина; IL-1ra – лечение рецепторным антагонистом интерлейкина-1 (анакинра, 100 мг/кг в сут), AOX – лечение смесью антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мг/кг S-аденозилметионина в сутки). ** – $p < 0.01$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением критерием Даннета – в качестве группы сравнения использованы нелеченные животные после эпилептического статуса; группа “Li” использована для демонстрации эффектов пилокарпиновых судорог на изучаемые показатели, напрямую не сравнивалась с животными после судорог, получавшими терапию)

В период эпилептогенеза в каинатной модели гены *Ppia* и *Actb* были описаны как оптимальные референсные гены в гиппокампе [27]. Мы же выявили, что в литий-пилокарпиновой модели, по крайней мере на фоне экспериментальной терапии, их экспрессия мало стабильна (рис. 1). Стоит также отметить, что в модели пентилентетразоловых судорог экспрессия гена *Ppia* была стабильна в дорзальном гиппокампе [29]. Интересно, что ранее *Actb* называли одним из наиболее стабильных референсных генов в гиппокампе крыс при эпилептогенезе, индуцированном системным введением пилокарпина (хлоридом лития) [28], однако наше исследование не подтверждает данные Marques с коллегами. Наблюдаемые расхождения мо-

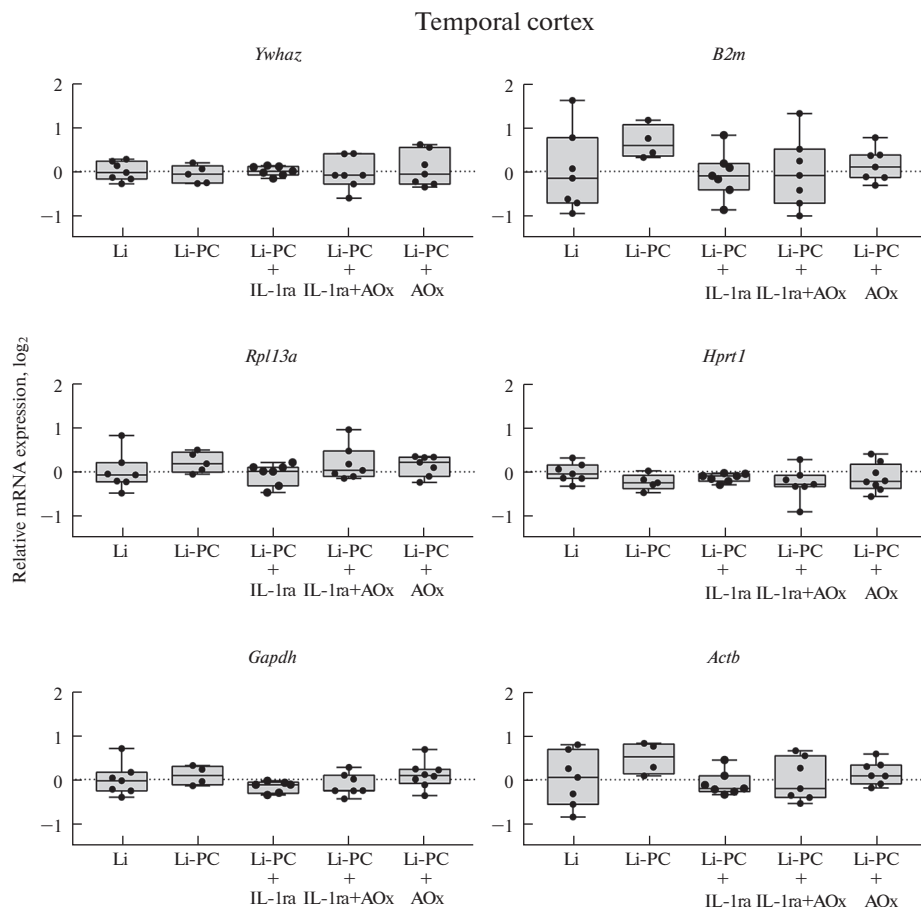


Рис. 3. Экспрессия референсных генов в височной области коры головного мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне отдельной и комбинированной терапии противовоспалительным цитокином IL-1ra. Li – контрольные животные без индукции судорог (только введение хлорида лития), Li-PC – животные, у которых вызывали эпилептический статус путем введения пилокарпина; IL-1ra – лечение рецепторным антагонистом интерлейкина-1 (анакинра, 100 мг/кг в сутки), АОx – лечение смесью антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мг/кг S-аденозилметионина в сутки).

гут объяснены иным выбором сроков: в процитированной работе стабильность экспрессии оценивали сразу после и через сутки после инъекции хемоконвульсанта, когда эффекты эпилептогенеза еще не выражены. Кроме того, в нашем случае эффекты вводимых препаратов могли дополнительно сказаться на стабильности экспрессии изучаемых генов. Данное противоречие подчеркивает важность экспериментального подбора оптимальных референсных генов с учетом исследуемой области мозга и экспериментальных условий, так как даже в близких моделях стабильность одних и тех же референсных генов может кардинально различаться.

В настоящей работе продемонстрировано усиление экспрессии генов *Actb* и *B2m* в гиппокампе крыс при экспериментальной индукции эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели, при этом данные эффекты были устойчивы к проведенной антиоксидантной и противовоспалительной терапии (рис. 2). Данный феномен требует дальнейшего изучения, так как, по-видимому, связан с патогенетическими

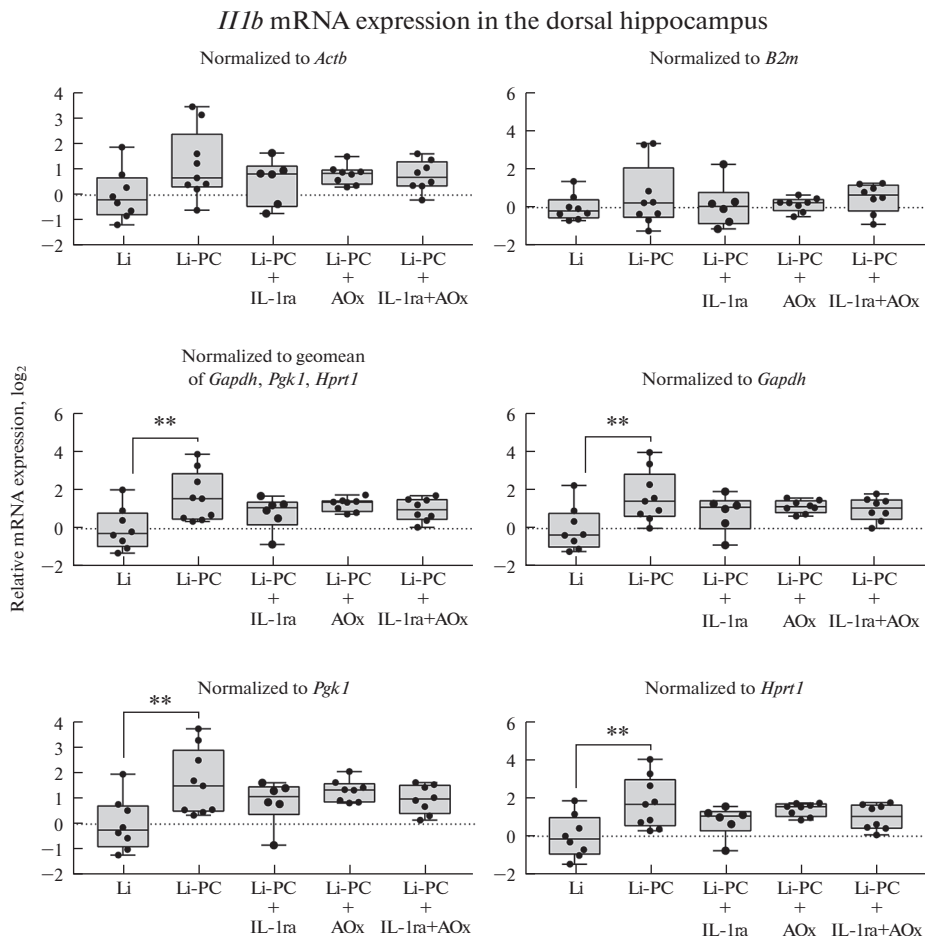


Рис. 4. Стратегия нормирования данных ОТ-кПЦР влияет на обнаружение изменений экспрессии гена *I1b* в дорсальной области гиппокампа крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Li – контрольные животные без индукции судорог (только введение хлорида лития), Li-PC – животные, у которых вызывали эпилептический статус путем введения пилокарпина; IL-1ra – лечение рецепторным антагонистом интерлейкина-1 (анакинра, 100 мг/кг в сут), AOx – лечение смесью антиоксидантов (100 мг/кг витамина С, 200 мг/кг витамина Е, 25 мг/кг S-аденозилметионина в сутки). Уровень экспрессии гена *I1b* был нормирован относительно уровня экспрессии каждого из трех наиболее стабильных референсных генов (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*), их геометрического среднего, или относительно двух самых нестабильных (*B2m* и *Actb*); ** $p < 0.01$ (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Даннета – попарное сравнение всех групп с нелечеными животными после эпилептического статуса).

перестройками – либо изменениями транскрипции, либо соотношением клеточных элементов нервной ткани. С учетом того, что *Actb* является одним из популярнейших референсных генов, часто используемых как единственный без дополнительной проверки [30], следует с осторожностью относиться к интерпретации данных ОТ-кПЦР в случае, если не проводится проверка стабильности референсных генов.

В нашем исследовании продемонстрировано, что выбор референсных генов может существенно повлиять на результаты исследования. Например, при нормализа-

ции результатов относительно генов *B2m* или *Actb*, которые в данной модели нежелательно использовать в качестве референсных, мы не наблюдали значимого увеличения экспрессии гена *Il1b*, которое обнаруживается при нормализации относительно любого из трех оптимальных референсных генов (рис. 4). Схожие эффекты были ранее продемонстрированы при анализе экспрессии гена белка програнулина (*Pgm*) в гиппокампе крыс в вальпроатной модели расстройств аутистического спектра: неоптимальный выбор стратегии нормализации приводил не только к исчезновению статистически выявляемых эффектов, но даже к ложному выявлению противоположных реальным изменений содержания целевой мРНК [6]. Стоит также отметить, что в упомянутой работе *Gapdh* оказывался наименее стабильным и невалидным референсным геном в гиппокампе, в то время как в настоящей работе (рис. 1), так и в наших предыдущих исследованиях на модели пентилентетразоловых судорог [31] он оказывается наиболее стабильным в дорзальном гиппокампе.

Таким образом, мы определили регионспецифичные оптимальные референсные гены для оценки уровня содержания целевых мРНК в дорзальном гиппокампе (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*) и височной коре (*Pgk1*, *Sdha*, *Ppia*) головного мозга крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии на фоне сочетанной или раздельной экспериментальной противовоспалительной и антиоксидантной терапии. При этом было выявлено значимое усиление экспрессии генов *Actb* и *B2m* в дорзальном гиппокампе, которое не подавлялось ни применением IL-1ra, ни смеси антиоксидантов (витамин С, витамин Е, аденозилметионин), ни их сочетанием.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-00127).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.З., А.П.Ш., А.В.Д.), сбор данных (А.В.Д., М.О.Г., А.П.Ш.), обработка данных (М.В.З., А.А.К., А.П.Ш.), написание и редактирование манускрипта (М.В.З., А.А.К., А.П.Ш., М.О.Г., А.М.И., А.В.З.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT* (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
2. *Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J* (2010) How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50: 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
3. *Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
4. *Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL* (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 7: 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
5. *Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP* (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509–515.
6. *Zhou J, Zhang X, Ren J, Wang P, Zhang J, Wei Z, Tian Y* (2016) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in valproic acid rat models of autism. *Mol Biol Rep* 43: 837–847. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4015-x>

7. Schwarz AP, Kovalenko AA, Malygina DA, Postnikova TY, Zubareva OE, Zaitsev AV (2020) Reference Gene Validation in the Brain Regions of Young Rats after Pentylentetrazole-Induced Seizures. *Biomedicines* 8: 239.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8080239>
8. Löscher W (2017) Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res* 42: 1873–1888.
<https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>
9. Terrone G, Balosso S, Pauletti A, Ravizza T, Vezzani A (2020) Inflammation and reactive oxygen species as disease modifiers in epilepsy. *Neuropharmacology* 167: 107742.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107742>
10. Dyomina AV, Kovalenko AA, Zakharova MV, Postnikova TY, Griflyuk AV, Smolensky IV, Antonova IV, Zaitsev AV (2022) MTEP, a Selective mGluR5 Antagonist, Had a Neuroprotective Effect but Did Not Prevent the Development of Spontaneous Recurrent Seizures and Behavioral Comorbidities in the Rat Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy. *Int J Mol Sci* 23: 497.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010497>
11. Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281–294.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
12. Ming Z, Fan Y, Yang X, Lautt WW (2006) Synergistic protection by S-adenosylmethionine with vitamins C and E on liver injury induced by thioacetamide in rats. *Free Radic Biol Med* 40: 617–624.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.034>
13. Dyomina AV, Zubareva OE, Smolensky IV, Vasilev DS, Zakharova MV, Kovalenko AA, Schwarz AP, Ischenko AM, Zaitsev AV (2020) Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy. *Pharmaceuticals (Basel)* 13: 340.
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
14. Schwarz AP, Malygina DA, Kovalenko AA, Trofimov AN, Zaitsev AV (2020) Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol Cell Probes* 53: 101611.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101611>
15. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245–5250.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
16. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
17. Lin W, Burks CA, Hansen DR, Kinnamon SC, Gilbertson TA (2004) Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *J Neurophysiol* 92: 2909–2919.
<https://doi.org/10.1152/jn.01198.2003>
18. Malkin SL, Amakhin DV, Veniaminova EA, Kim KK, Zubareva OE, Magazanik LG, Zaitsev AV (2016) Changes of ampa receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuroscience* 327: 146–155.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.024>
19. Yamaguchi M, Yamauchi A, Nishimura M, Ueda N, Naito S (2005) Soybean Oil Fat Emulsion Prevents Cytochrome P450 mRNA Down-Regulation Induced by Fat-Free Overdose Total Parenteral Nutrition in Infant Rats. *Biol Pharm Bull* 28: 143–147.
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.143>
20. Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008) Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse* 62: 302–309.
<https://doi.org/10.1002/syn.20496>
21. Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol* 9: 53.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-53>
22. Swijsen A, Nelissen K, Janssen D, Rigo J-M, Hoogland G (2012) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res Notes* 5: 685.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-685>
23. Kyzar EJ, Zhang H, Sakharkar AJ, Pandey SC (2017) Adolescent alcohol exposure alters lysine demethylase 1 (LSD1) expression and histone methylation in the amygdala during adulthood. *Addict Biol* 22: 1191–1204.
<https://doi.org/10.1111/adb.12404>
24. Pohjanvirta R, Niittynen M, Lindén J, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB (2006) Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chem Biol Interact* 160: 134–149.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.01.001>

25. *Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF* (2004) Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol* 137: 65–73.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02499.x>
26. *Paxinos G, Watson C* (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates – The New Coronal Set*, 5th ed. Elsevier Acad Press. San Diego, CA.
27. *Sadangi C, Rosenow F, Norwood BA* (2017) Validation of reference genes for quantitative gene expression analysis in experimental epilepsy. *J Neurosci Res* 95: 2357–2366.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24089>
28. *Marques TEBS, de Mendonça LR, Pereira MG, de Andrade TG, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson ML, Gital DLG* (2013) Validation of Suitable Reference Genes for Expression Studies in Different Pilocarpine-Induced Models of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS One* 8: e71892.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071892>
29. *Schwarz AP, Kovalenko AA, Malygina DA, Postnikova TY, Zubareva OE, Zaitsev AV* (2020) Reference Gene Validation in the Brain Regions of Young Rats after Pentylentetrazole-Induced Seizures. *Biomedicines* 8: 239.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8080239>
30. *Chapman JR, Waldenström J* (2015) With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One* 10: e0141853.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853>
31. *Schwarz AP, Kovalenko AA, Malygina DA, Postnikova TY, Zubareva OE, Zaitsev AV* (2020) Reference Gene Validation in the Brain Regions of Young Rats after Pentylentetrazole-Induced Seizures. *Biomedicines* 8: 239.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8080239>

The Reference Gene Validation in the Brain of Rats during Antioxidant and Anti-Inflammatory Treatment in the Lithium–Pilocarpine Model of Temporal Epilepsy

**A. P. Schwarz^{a, *}, A. V. Dyomina^a, M. V. Zakharova^a, A. A. Kovalenko^a,
M. O. Gryaznova^a, A. M. Ischenko^b, and A. V. Zaitsev^a**

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, Saint Petersburg, Russia*

^b*Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, Saint Petersburg, Russia*

**e-mail:aleksandr.pavlovich.schwarz@gmail.com*

Reverse transcription combined with quantitative (real-time) polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the gold standard for assessing gene expression, but requires careful selection of valid reference genes to normalize the results. The aim of this work was to determine the optimal reference genes for RT-qPCR experiments in the temporal cortex and dorsal hippocampus of the rat brain in the latent phase (the period of epileptogenesis before the onset of spontaneous recurrent seizures) of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy during the separate or combined treatment with recombinant pro-inflammatory cytokine, an interleukin-1 receptor antagonist (100 mg/kg i.p. per day) and a balanced antioxidant cocktail (100 mg/kg vitamin C, 200 mg/kg vitamin E, 25 mcg/kg S-adenosylmethionine i.p. per day). The expression of 9 reference genes (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) was analyzed. Using the RefFinder® online tool, we determined the optimal reference genes for assessing the levels of target mRNAs in the dorsal hippocampus (*Gapdh*, *Pgk1*, *Hprt1*) and temporal cortex (*Pgk1*, *Sdha*, *Ppia*). At the same time, we revealed a significant increase in the expression of the *Actb* and *B2m* genes in the dorsal hippocampus, which was not suppressed either by the treatment with IL-1ra, or by a mixture of antioxidants (vitamin C, vitamin E, adenosylmethionine), or by their combination. Based on this, the *Actb* and *B2m* genes may be involved in the epileptogenesis and cannot be used as reference genes in epileptic models. Thus, the results of our work highlight the importance of careful selection of reference genes.

Keywords: RT-PCR, reference genes, gene expression, mRNA, temporal lobe epilepsy, lithium-pilocarpine model, brain, real time PCR