СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Роль NMDA-рецепторов в эпилептогенезе
Ю. Л. Ергина, А. А. Коваленко, А. В. Зайцев 1455

Роль апоптоза при инфекциях
И. С. Фрейдлин, Д. Т. Маммедова, Э. А. Старикова 1479

Экспериментальные статьи

Возрастная динамика функционального состояния сетчатки у мышей с наследственной дегенерацией фоторецепторов
А. А. Горяченков, А. Ю. Ротов, М. Л. Фирсов 1496

Флавоноид кверцетин уменьшает двигательную активность и повышает эмоциональную реактивность у крыс
М. В. Чернышев, Д. В. Белан, О. А. Сапач, И. В. Екимова 1512

Эффекты стимуляции инфралимбической коры на реакции нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации, вызванные ноцицептивным раздражением толстой кишки крысы
С. С. Пантелеев, И. Б. Сиваченко, И. И. Бусыгина, О. А Любашина 1524

Генерализация страха обстановки зависит от активности серотониновой системы медиальной префронтальной коры
Н. Б. Саульская, О. Э. Марчук 1541

Влияние нефрэктомии на реактивность артерий крыс линии Wistar-Kyoto
В. Н. Ярцев, Г. Т. Иванова, Г. И. Лобов 1553

Влияние ролипрама на осморегулирующую функцию почек у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови
П. Д. Правикова, Т. С. Курляндчик, Л. Н. Иванова 1564

Методические статьи

Эффективность доставки генов в клетки мозга рыб при помощи рекомбинантных аденоассоциированных вирусов гиппокампа мыши
Е. В. Пущина, Я. Н. Александрова, А. А. Вараксин, Д. К. Обухов 1571

CONTENTS

Reviews

Role of NMDA Receptors in Epileptogenesis
J. L. Ergina, A. A. Kovalenko, and A. V. Zaitsev 1455

Apoptosis in Infection
I. S. Freidlin, J. T. Mammedova, and E. A. Starikova 1479

Experimental Articles

Age-Related Dynamics of the Retinal Functional State in Mice with Inherited Photoreceptor Degeneration
A. A. Goriachenkov, A. Yu. Rotov, and M. L. Firsov 1496

Flavonoid Quercetin Attenuates Locomotor Attivity and Enhances Emotional Reactivity in Rats
M. V. Chernyshev, D. V. Belan, O. A. Sapach, and I. V. Ekimova 1512

Effects of the Infralimbic Cortex Stimulation on the Caudal Ventrolateral Reticular Formation Neuron Responses to the Nociceptive Rat Colon Distension
S. S. Panteleev, I. B. Sivachenko, I. I. Busygina, and O. A. Lyubashina 1524

Contextual Fear Generalization Depends on the Activity of the Medial Prefrontal Cortex Serotonergic System
N. B. Saulskaya and O. E. Marchuk 1541

Effect of Nephrectomy on the Reactivity of Arteries from the Wistar-Kyoto Rats
V. N. Yartsev, G. T. Ivanova, and G. I. Lobov 1553

Effect of Rolipram Treatment on the Osmoregulatory Renal Function in Rats with Different Blood Vasopressin Level
P. D. Pravikova, T. S. Kurlandchik, and L. N. Ivanova 1564

Methodical Articles

The Efficacy of Gene Delivery into Fish Brain Cells Using the Recombinant Adeno-Associated Mouse Hippocampal Viruses
E. V. Pushchina, Y. N. Alexandrova, A. A. Varaksin, and D. K. Obukhov 1571

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1455–1478

ОБЗОРЫ

РОЛЬ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ В ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗЕ

© 2020 г. Ю. Л. Ергина[1], А. А. Коваленко[1], А. В. Зайцев[1, *]

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

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

Поступила в редакцию 01.09.2020 г.
После доработки 26.09.2020 г.
Принята к публикации 28.09.2020 г.

Эпилепсия характеризуется повторяющимися, возникающими внезапно эпилептическими приступами. При эпилепсии почти в 30% случаев наблюдается фармакорезистентность, в результате чего болезнь может прогрессировать и приводить к ухудшению когнитивных способностей и возникновению сопутствующих психоневрологических заболеваний. Раннее терапевтическое вмешательство способно снизить тяжесть протекания заболевания, а подавление эпилептогенеза считается наиболее перспективной стратегией предотвращения развития эпилепсии после провоцирующих это заболевание событий. NMDA-рецепторы рассматриваются как одна из перспективных мишеней для подавления эпилептогенеза. Нарушение функций NMDA-рецепторов фиксируется на всех этапах развития эпилепсии. Изменения в их экспрессии наблюдаются уже в первые часы после острых судорог, а сами NMDA-рецепторы активно вовлечены в генерацию эпилептической активности. Кроме того, антагонисты NMDA-рецепторов эффективно подавляют эпилептиформную активность в различных моделях судорожных состояний и эпилептического статуса. В этом обзоре мы рассматриваем имеющиеся данные о том, какую роль NMDA-рецепторы играют в развитии эпилепсии, как меняется их экспрессия в разные периоды эпилептогенеза, а также обсуждаем перспективы применения антагонистов и модуляторов NMDA-рецепторов для предотвращения эпилептогенеза.

Ключевые слова: NMDA-рецептор, антагонист NMDA-рецепторов, субъединицы NMDA-рецепторов, эпилептогенез, модели эпилепсии

DOI: 10.31857/S0869813920120031

Эпилепсия – распространенное неврологическое заболевание, характеризующееся повторяющимися неспровоцированными приступами. По оценкам ВОЗ почти 1% населения страдает от эпилепсии. Несмотря на успехи в создании новых противоэпилептических препаратов, полного избавления от судорожных припадков не удается достичь почти у трети больных. Хотя эпилепсия может носить наследственный характер, что часто является следствием генетических аномалий, в большинстве случаев эпилепсия представляет собой приобретенное заболевание. Этиология приобретенной эпилепсии разнообразна, в качестве возможных триггеров могут выступать: эпилептический статус, инсульт, черепно-мозговая травма, пренатальные или перинатальные травмы, инфекции, фебрильные судороги, аутоиммунные заболевания, опухоли головного мозга [1–4]. После воздействия проэпилептических факторов наблюдается так называемый латентный период, предшествующий появлению спонтанной рецидивирующей эпилептической активно-

сти. В течение латентного периода наблюдается как гибель нейронов, так и нейрогенез, разрастание аксонов и реорганизация связей между нейронами, изменение баланса возбуждающей и тормозной синаптической передачи, нейровоспалительные процессы и глиоз, нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера [5]. Являясь прогрессирующим заболеванием, эпилепсия сопровождается снижением когнитивных способностей, возникновением сопутствующих психоневрологических нарушений и развитием фармакорезистентности. Раннее терапевтическое вмешательство способно снизить тяжесть протекания заболевания, но именно предотвращение эпилептогенеза считается наиболее перспективной стратегией [6, 7]. К сожалению, до настоящего времени эффективной терапии, предотвращающей развитие эпилепсии, не разработано.

NMDA-рецепторы, ответственные за длительную фазу глутаматергической передачи, рассматриваются в качестве возможной терапевтической мишени для подавления судорожных состояний и эпилептогенеза. Изменения экспрессии этих рецепторов неоднократно показаны в тканях мозга пациентов с эпилепсией [8, 9], а антагонисты NMDA-рецепторов эффективно подавляют эпилептиформную активность в ряде экспериментальных моделей эпилепсии [10, 11]. Однако наличие выраженных побочных эффектов при длительном применении позволяет использовать известные на сегодняшний день антагонисты NMDA-рецепторов исключительно в качестве экстренного средства, например, для лечения эпилептического статуса, устойчивого к терапии первой линии. Тем не менее, продолжается активный поиск фармакологических агентов, способных регулировать работу NMDA-рецепторов с минимальными побочными эффектами. В этом обзоре мы анализируем новые экспериментальные данные об изменениях экспрессии NMDA-рецепторов в различных моделях эпилепсии, их участии в эпилептогенезе, а также рассматриваем перспективы воздействия на NMDA-рецепторы при терапии эпилептогенеза.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ NMDA-РЕЦЕПТОРАХ

NMDA-рецептор – один из трех типов ионотропных глутаматных рецепторов. Ионотропные глутаматные рецепторы представляют собой интегральные мембранные белки, состоящие из четырех крупных субъединиц (более 900 аминокислотных остатков), которые образуют центральную пору ионного канала [12–14]. Функциональные рецепторы образуются исключительно путем сборки субъединиц в пределах одного функционального класса рецепторов [15]. К настоящему моменту известны различные субъединицы NMDA-рецепторов (GluN1, GluN2A-D, GluN3A и GluN3B), отличающихся по своим физиологическим и фармакологическим свойствам [16]. Для сборки функционального NMDA-рецептора требуются две GluN1-субъединицы, являющиеся облигатными, а также присутствие двух других субъединиц – это могут быть две GluN2-субъединицы или же комбинация субъединиц GluN2 и GluN3 [17, 18]. Гомозиготные мутантные мыши, лишенные GluN1-субъединицы, погибают спустя несколько часов после рождения [19].

Субъединицы NMDA-рецепторов имеют идентичную мембранную топологию (рис. 1*А*). Все субъединицы содержат большой внеклеточный N-концевой домен, три трансмембранных домена (M1, M3, M4), порообразующий (M2) и внутриклеточный C-концевой домены. Функционально у субъединиц можно выделить амино-концевой (ATD), лиганд-связывающий (LBD), трансмембранный (TMD) и цитозольный домены (CTD) [20]. Показано, что ATD участвует в регуляции открытия канала и его инактивации, а также отвечает за аллостерическую регуляцию активности ионного канала путем связывания с модуляторными соединениями. Роль регуляции через ATD для NMDA-рецепторов выражена сильнее, чем для других ионотропных рецепторов глутамата [21]. LBD тремя короткими линкерами связан

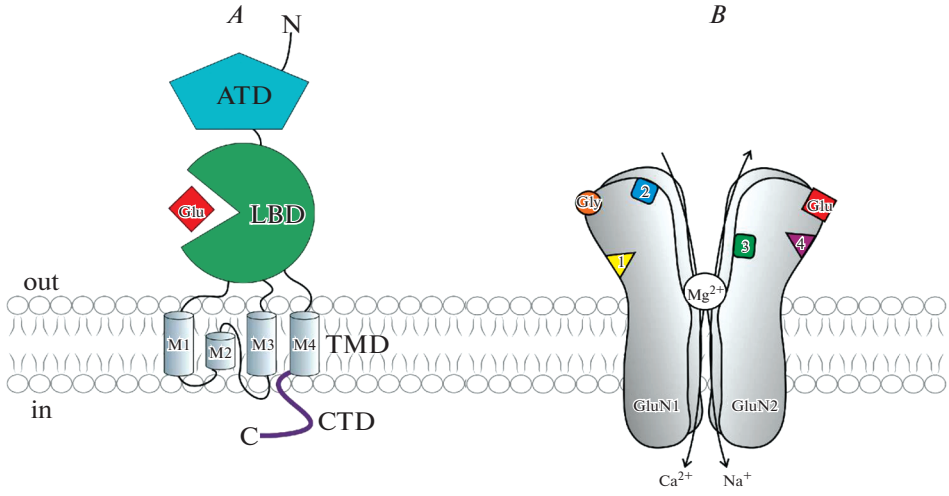


Рис. 1. *A* – схематическое изображение мембранной топологии субъединицы NMDA-рецептора. ATD – амино-концевой домен, LBD – лиганд-связывающий домен, TMD – трансмембранный домен, CTD – цитозольный домен, Glu – глутамат. *B* – схематическое изображение регуляторных сайтов NMDA-рецептора. Gly, Glu – сайты специфического связывания медиатора (глутамат) и коагониста (глицин). Модуляторные сайты: 1 – полиаминовый сайт, 2 – сайт связывания неконкурентных антагонистов, 3 – сайт связывания двухвалентных катионов, 4 – сайт связывания нейростероидов. На схеме также показан транспорт ионов Na^+, K^+ и Ca^{2+} через ионный канал NMDA-рецептора, в покое пора рецептора заблокирована ионом Mg^{2+}. Воспроизведено с модификациями по [20, 61].

Fig. 1. *A* – schematic illustration of the NMDA receptor subunit topology. ATD – amino-terminal domain, LBD – ligand binding domain, TMD – transmembrane domain, CTD – carboxyl-terminal domain, Glu – glutamate. *B* – schematic illustration of the NMDA receptor regulatory sites. Gly, Glu – a mediator (glutamate) and a coagonist (glycine) specific binding sites. Modulatory sites: 1 – polyamine site, 2 – non-competitive antagonist binding site, 3 – bivalent cation binding site, 4 – neurosteroid binding site. The figure also shows the transport of Na^+, K^+ and Ca^{2+} through the NMDA receptor ion channel; at rest, the receptor pore is blocked by the Mg^{2+}. Reproduced with modifications from [20, 61].

с TMD. Трансмембранные спирали M1, M3 и M4 от каждой из четырех субъединиц способствуют формированию ионного канала [20]. CTD является наиболее вариабельным доменом и имеет важное значение при регуляции работы канала. Цитозольные домены содержат различные сайты фосфорилирования и сайты связывания внутриклеточных белков, что определяет их роль в регуляции функции рецептора [20]. В частности, CTD GluN1-субъединицы участвует в инактивации рецептора. Цитозольные домены GluN2 необходимы для нормального функционирования NMDA-рецептора, что было продемонстрировано в экспериментах по их удалению или укорочению [22, 23].

Существуют как дигетеромерные, так и тригетеромерные NMDA-рецепторы. В переднем мозге грызунов специфические антитела к GluN2A эффективно иммунопреципитируют к GluN2B и наоборот, что указывает на образование GluN1/GluN2A/GluN2B-тригетеромеров [24]. GluN1/GluN2A/GluN2D- и GluN1/GluN2B/GluN2D-тригетеромеры были обнаружены в таламусе и среднем мозге крысы [25]. Согласно данным иммуноблотного анализа, GluN1/GluN2A/GluN2B-тригетеромеры могут составлять от 10 до 50% и более от общего числа NMDA-рецепторов [26]. Данные последних электрофизиологических исследований указывают на значительный вклад GluN1/GluN2A/GluN2B-тригетеромеров в NMDA-рецеп-

тор-опосредованную активность в CA3-CA1 синапсах гиппокампа взрослых животных [27, 28]. Для активации NMDA-рецепторов необходимо одновременное связывание с ними глутамата и глицина, что отличает их от других типов глутаматных рецепторов [29]. Сайты связывания глицина расположены на GluN1- и GluN3-субъединицах [30, 31], в то время как GluN2-субъединицы выступают в качестве сайтов связывания глутамата [30]. Помимо глицина, D- и L-изомеры серина и аланина также служат агонистами субъединицы GluN1 [32, 33]. По сравнению с L-серином, D-серин мощнее и может выступать в качестве основного лиганда к GluN1 в таких областях, как супраоптическое ядро [34]. D-серин синтезируется из L-серина серин-рацемазой в астроцитах [35] и нейронах [36, 37]. К эндогенным агонистам GluN2-субъединицы, помимо глутамата, относятся D- и L-аспартат [38, 39], гомоцистеин и цистеин сульфинат [40, 41].

Четыре глутамат-связывающих GluN2A-D-субъединицы ответственны за биофизические свойства NMDA-рецепторов, а их преобладание зависит от области мозга и периода развития [42–45]. GluN2-субъединицы влияют на эффективность действия глутамата. Например, полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) для NMDA-рецепторов, содержащих две субъединицы GluN1 и две субъединицы GluN2D, в пять раз ниже, чем для рецепторов, содержащих GluN1/2A, тогда как рецепторы GluN1/2B и GluN1/2C имеют промежуточные значения EC_{50} [46–48]. Скорость деактивации после отсоединения глутамата, влияющая на продолжительность ВПСТ [49], варьирует более чем в 100 раз между различными GluN2-субъединицами [50]. GluN1/2A- и GluN1/2B-содержащие NMDA-рецепторы имеют более высокую проводимость одиночных каналов, чем GluN1/2C и GluN1/2D [51–53].

Канал NMDA-рецептора проницаем для ионов Ca^{2+}, Na^{+} и K^{+}. Разные подтипы NMDA-рецепторов демонстрируют сходную проницаемость для ионов Na^{+} и K^{+} ($P_K/P_{Na} = 1.14$), при этом они более проницаемы для ионов Ca^{2+} по сравнению с одновалентными ионами ($P_{Ca}/P_X = 1.8–4.5$). Степень проницаемости для Ca^{2+} зависит от типа GluN2-субъединицы [54, 55]. GluN1/2A и GluN1/2B обладают более высокой проницаемостью для Ca^{2+} и более чувствительны к Mg^{2+}-блоку, чем GluN1/2C и GluN1/2D [42, 56]. Важной функциональной особенностью NMDA-рецепторов является Mg^{2+}-блок, который сильно зависит от мембранного потенциала и возрастает при его сдвиге к негативным значениям. Величина IC_{50} (концентрации, обеспечивающей половину от максимально возможного блока) составляет 2, 2, 14 и 10 мкМ для GluN1/2A, GluN1/2B, GluN1/2C и GluN1/2D соответственно при потенциале фиксации равном –100 мВ [57]. Эффективность Mg^{2+}-блока субъединицы GluN2 зависит от множества структурных особенностей, но главным критерием, по-видимому, является единственный аминокислотный остаток в сайте S/L, расположенном в трансмембранной петле M3 [56]. Эти биофизические различия важны тем, что чувствительность к потенциал-зависимому Mg^{2+}-блоку может влиять на временное окно для выработки пластичности, зависящей от времени спайков (spike-timing-dependent plasticity) [58–60].

ФАРМАКОЛОГИЯ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

NMDA-рецепторный комплекс имеет несколько сайтов регуляции: сайты специфического связывания медиатора и коагониста, модуляторные сайты: полиаминовый, сайты связывания двухвалентных катионов и протонов, участки связывания неконкурентных модуляторов [61] (рис. 1*B*). Функционирование NMDA-рецепторов модулируется рядом эндогенных и экзогенных соединений, которые

могут оказывать противоположный эффект, зависящий от природы лиганда. Соединения, которые взаимодействуют с сайтами связывания основного медиатора или коагониста и блокируют работу NMDA-рецептора, являются конкурентными антагонистами. В то же время существует ряд соединений, которые наряду с глутаматом и глицином являются агонистами данного рецептора. К неконкурентным модуляторам относится широкий спектр лигандов, способных аллостерически взаимодействовать с NMDA-рецептором. Важной особенностью данного типа глутаматных рецепторов является различная чувствительность к неконкурентным антагонистам, которая зависит от субъединичного состава рецептора. Кроме того, существует ряд соединений, блокирующих пору канала NMDA-рецептора [16, 20].

Конкурентные антагонисты

Конкурентными антагонистами NMDA-рецепторов являются производные фосфоновой кислоты, 2-амино-5-фосфо-валериановая кислота (AP5) и 2-амино-7-фосфо-гептановая кислота (AP7). Вскоре после того, как AP7 и AP5 были идентифицированы в качестве сильных селективных антагонистов, был продемонстрирован противосудорожный эффект этих соединений при внутрибрюшинном и внутрижелудочковом введении мышам, тонико-клонические судороги у которых вызывались введением пороговых доз пентилентетразола (PTZ) [62]. Конкурентные антагонисты NMDA-рецепторов показали высокую эффективность в рамках моделей рефлекторной эпилепсии. Например, одна пероральная доза D(-)E-4-(3-фосфоно-проп-2-енил)-пиперазин-2-карбоновой кислоты (D-CPPene) предотвращает возникновение фотоиндуцированной эпилептической реакции в течение 24–48 ч у светочувствительного бабуина *Papio papio* без каких-либо заметных моторных или седативных побочных эффектов [63].

Неконкурентные модуляторы

Аллостерические модуляторы. Поскольку биофизические свойства NMDA-рецепторов сильно зависят от входящих в их состав GluN2-субъединиц, поиск фармакологических агентов, способных контролировать отдельные подтипы этих рецепторов, был сосредоточен на молекулах, избирательно действующих на отдельные GluN2-субъединицы [64, 65].

Кристаллографические исследования продемонстрировали, что GluN2B-селективные негативные аллостерические модуляторы, такие как ифенпродил и Ro 25–6981, связываются с модуляторным сайтом, расположенным между ATD-доменами GluN1- и GluN2B-субъединиц [66–68]. Только один аминокислотный остаток в этом модулирующем сайте отличается у GluN2A- и GluN2B-субъединиц, однако, преобразования этого или других остатков GluN2A в остатки GluN2B недостаточны для изменения чувствительности рецептора к ифенпродилу [66, 69]. Это объясняется особенностями взаимного расположения ATD-доменов, в частности, “карман”, формируемый GluN1/2B-субъединицами, имеет идеальный размер для аналогов ифенпродила, тогда как субъединицы смещены на ~10° в случае GluN1/2A [70].

Каналоблокаторы. Пора ионного канала NMDA-рецептора может быть потенциал-зависимо заблокирована широким спектром органических катионов с разнообразной химической структурой [71]. Подобные соединения, как правило, блокируют открытые каналы активированных рецепторов и являются положительно заряженными соединениями при физиологических значениях pH, такой механизм блока канала рецептора является проявлением неконкурентного антагонизма. В целом, блокаторы открытых каналов можно разделить на три категории в зависимости от способа их взаимодействия с каналом: (1) поэтапные блокаторы (например, производные аминоакридина и тетрапентиламмоний) могут связываться

только с открытым каналом, после чего предотвращают его закрытие [72–74]; (2) частичные блокаторы ловушечного типа (например, амантадин и мемантин), входя в канал, препятствуют закрытию каналов, но не могут полностью предотвратить его [75–77]; и (3) полные блокаторы ловушечного типа (например, Mg^{2+}, кетамин, фенциклидин и МК-801), оставаясь внутри поры канала после его закрытия, не препятствуют диссоциации молекул агонистов от сайтов связывания на рецепторе [78, 79]. Было также показано, что некоторые каналоблокаторы способствуют закрытию канала, предположительно воздействуя на воротный механизм [77]. Считается, что часть каналоблокаторов обладает бифункциональностью – например, производные нитромемантина, которые связываются с порой канала и тем самым облегчают взаимодействие нитрогруппы с окислительно-восстановительным регуляторным сайтом рецептора [80].

NMDA-РЕЦЕПТОРЫ И ФЕНОМЕН ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ

При эпилептогенезе одним из патогенетических механизмов, приводящих к гибели нейронов, является эксайтотоксичность. Чрезмерная концентрация внеклеточного глутамата может активировать избыточное число постсинаптических NMDA-рецепторов, как синаптических, так и экстрасинаптических, что ведет к поступлению в нейроны большого числа ионов и вызывает их гибель. Кроме того, причиной избыточного накопления глутамата в межклеточном пространстве, помимо высвобождения из пресинаптических терминалей, может быть увеличенный выход глутамата из астроцитов [81, 82]. Определено шесть возможных путей этого процесса: (1) нарушение поглощения глутамата, (2) открытие анионных каналов на астроцитах под воздействием гипотонической среды, (3) Ca^{2+}-зависимый экзоцитоз, (4) выход глутамата через цистин-глутаматный антитранспортер, (5) высвобождение глутамата, опосредованное ионотропными пуринергическими рецепторами и (6) через функциональные непарные коннексоны на поверхности клетки [83]. Тем не менее, остается неясным, какой вклад вносит каждый из этих путей. Экспериментальные данные подтверждают роль астроцитов в повышении внеклеточных концентраций глутамата – например, при чрезмерной деполяризации нейронов в ходе эпилептической активности, приводящей к повышению внеклеточной концентрации K^+, наблюдалось нарушение поглощения глутамата астроцитами [84]. В норме одна молекула глутамата транспортируется в астроциты и пресинаптические окончания вместе с тремя катионами Na^+, при этом один катион K^+ удаляется [85]. Повышение внеклеточной концентрации K^+ приводит к обратному течению этого процесса – K^+ поглощается астроцитами и пресинаптическими окончаниями, а глутамат и Na^+ начинают высвобождаться [85].

В 2002 г. Hardingham с соавт. показали, что эксайтотоксическая гибель нейронов связана с активностью экстрасинаптических NMDA-рецепторов, в то время как синаптические NMDA-рецепторы выполняют нейропротекторную функцию [86]. На наличие связи между экстрасинаптическими рецепторами и эксайтотоксичностью указывает и тот факт, что в случае ишемии экстрасинаптические NMDA-рецепторы взаимодействуют с апоптотической киназой DAPK1 [87]. В то же время, некоторые исследования противоречат гипотезе о четком разделении роли синаптических и экстрасинаптических рецепторов в эксайтотоксичности. Так, эксайтотоксическая гибель нейронов была опосредована именно синаптическими NMDA-рецепторами в культуре нейронов гиппокампа [88]. Кроме того, подавление экспрессии скэффолд-белка постсинаптической плотности PSD-95, ассоциированного с NMDA-рецепторами, избирательно ослабляет эксайтотоксичность в культуре нейронов коры [89].

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ СУБЪЕДИНИЦ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ ВО ВРЕМЯ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗА

При эпилепсии часто выявляется нарушение свойств NMDA-рецепторов, обусловленное изменением их субъединичного состава, числа NMDA-рецепторов или их локализации [90]. Эти изменения со стороны NMDA-рецепторов могут возникать в результате гиперактивности в ЦНС, наблюдаемой при судорожных состояниях, и также могут поддерживать патологическую гиперактивность. Роль NMDA-рецепторов в эпилептогенезе в настоящее время довольно активно исследуется. Ряд экспериментальных работ посвящен изучению изменений экспрессии генов субъединиц NMDA-рецепторов после судорожных состояний (табл. 1) [91–94]. Анализ изменений субъединичного состава NMDA-рецепторов на ранних сроках после первого судорожного приступа позволяет выявить потенциальный вклад данных рецепторов в эпилептогенез.

Ранние изменения после судорожных состояний

При различных моделях судорожных состояний были выявлены быстрые изменения экспрессии субъединиц NMDA-рецепторов после эпилептической активности. Так, кратковременная гиперэкспрессия GluN1- и GluN2B-субъединиц наблюдается *in vitro* и *in vivo* при пилокарпиновой модели [95, 97]. Di Maio с соавт. предположили, что такая гиперэкспрессия является результатом активации двух независимых сигнальных путей: кальций-зависимого НАДФ-оксидазного пути и пути, запускаемого фосфорилированием киназ ERK1/2 [95, 96]. Работая с культурой нейронов гиппокампа, они показали, что кратковременное воздействие пилокарпина вызывает быструю гиперэкспрессию GluN2B-субъединицы, наблюдаемую через 24 ч после воздействия [95], и впоследствии приводит к усилению экспрессии GluN2A-субъединицы [96]. Аналогичные данные были получены в острую фазу пилокарпиновой модели: было выявлено повышение экспрессии как GluN2A-, так и GluN2B-субъединиц [97]. Ранняя активация продукции GluN2B-субъединицы была выявлена в гиппокампе после судорог, вызванных пентилентетразолом [99], и в модели пентилентетразол-индуцированного киндлинга [102]. В то же время в модели киндлинга с использованием 3-меркаптопропионата различными исследователями выявлено снижение продукции GluN2B-субъединицы в гиппокампе и мозжечке [105, 106]. Данное противоречие, возможно, связано с тем, что был использован другой конвульсант. Также в гиппокампе взрослых крыс на следующий день после последнего введения 3-меркаптопропионовой кислоты, которую вводили 1 раз в течение 4 дней в дозе 45 мг/кг, было показано повышение экспрессии гена, кодирующего GluN2A-субъединицу [104]. При использовании модели острого эпилептического статуса через 1 ч после индукции также обнаруживается увеличение экспрессии гена GluN2A-субъединицы в гиппокампальной области мышей [91]. Противоречия в полученных результатах могут быть обусловлены тем, что были использованы различные экспериментальные модели, модельные животные и подходы к анализу экспрессии.

Латентный период эпилептогенеза

Большой интерес вызывают функциональные изменения в работе NMDA-рецепторов во время эпилептогенеза, так как эти изменения могут быть одним из патофизиологических механизмов эпилепсии. Для изучения таких изменений часто используют эпилептические модели на животных. В этих моделях после первичного воздействия, вызвавшего судороги, наблюдается латентный период, после которого формируются спонтанные рецидивирующие судорожные приступы. В част-

Таблица 1. Изменения экспрессии NMDA-рецепторов в различных моделях судорожных состояний и эпилепсии
Table 1. Changes in the expression of NMDA receptors in various seizure models and models of epilepsy

Модель Model	Срок анализа Measurement time	Область мозга Brain region	Изменения экспрессии Changes in the expression	Ссылки Links
Пилокарпиновая (*in vitro*) Pilocarpine (*in vitro*)	24 ч 24 h	Культура гиппокампа Hippocampal culture	GluN1↑ GluN2A↑ GluN2B↑	[95], [96]
Пилокарпиновая (*in vivo*) Pilocarpine (*in vivo*)	24 ч 24 h	Гиппокамп Hippocampus	GluN2A↑ GluN2B↑	[97] [98]
	4–10 недель 4–10 weeks	Гиппокамп Hippocampus	GluN2B↑	
Пентилентетразоловая Pentylenetetrazole	24 ч 24 h	Гиппокамп Hippocampus	GluN2B↑ GluN1↓ GluN1↓	[99] [100] [101]
Киндлинг Конвульсанты: Kindling Convulsants:				
Пентилентетразол Pentylenetetrazole	24 ч 24 h	Гиппокамп Hippocampus	GluN2B↑ GluN1↓	[102] [103]
3-меркаптопропионат 3-mercaptopropionate	24 ч 24 h	Гиппокамп Hippocampus	GluN2A↑	[104]
		Мозжечок Cerebellum	GluN2B↓	[105]
		Гиппокамп Hippocampus	GluN2B↓	[106]
Пентилентетразол Pentylenetetrazole	3 дня 3 days	Кора, гиппокамп Cortex, hippocampus	GluN1↑ GluN2A↑	[107]
Литий-пилокарпиновая Lithium-Pilocarpine	7 дней 7 days 21 день 21 days	кора cortex гиппокамп hippocampus	GluN1↓ GluN2A↓ GluN1↑ GluN2B↑	[94] [108]
Каинатная Kainate	24 и 72 ч 24 and 72 hours	гиппокамп hippocampus	GluN1↓	[109]
Гипоксическая Hypoxic	2–4 дня 2–4 days	гиппокамп hippocampus	GluN2A↑ GluN3A↑	[110]

ности, такими моделями являются литий-пилокарпиновая [111] и каинатная [112]. Считается, что латентный период сопровождается патофизиологическими изменениями, которые приводят к эпилептизации мозга и развитию спонтанных судорог [113, 114]. В связи с этим особое внимание уделяется изучению изменений, происходящих с NMDA-рецепторами, именно в этот период.

Снижение экспрессии облигатной GluN1-субъединицы обнаруживается в различных областях коры в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели [93, 115]. Данное изменение может свидетельствовать об уменьшении общего числа NMDA-рецепторов. Однако в более ранние сроки в гиппокампе, напротив, наблюдается повышение продукции мРНК данной субъединицы [95], это может свидетельствовать о том, что наблюдаемые изменения экспрессии GluN1-субъединицы являются регион-специфичными. Кроме того, показано, что во время латентного периода литий-пилокарпиновой модели эпилепсии наблюдается повышенная иммунореактивность к pGluN1-Ser896-фосфорилированному в положении Ser896 участку С-концевого хвоста GluN1-субъединицы NMDA-рецептора. Фосфорили-

рование этого сайта регулирует экспрессию NMDA-рецепторов и их кластеризацию [116–119], а также предотвращает кальмодулин-опосредованную инактивацию NMDA-рецепторов [120, 121]. Наибольшая pGluN1-Ser896-иммунореактивность наблюдалась в пирамидных нейронах области CA1 гиппокампа и гранулярных клетках зубчатой извилины на третьи сутки после эпилептического статуса. Спустя неделю после эпилептического статуса, pGluN1-Ser896-иммунореактивность в нейронах областей CA2–CA3 гиппокампа и гранулярных клетках зубчатой извилины снижалась, хотя и оставалась выше, чем у контрольных животных. В пирамидных клетках области CA1 pGluN1-Ser896-иммунореактивность спустя неделю оказалась выше, чем на третьи сутки после эпилептического статуса [122].

В латентный период происходят изменения экспрессии GluN2A- и GluN2B-субъединиц аналогичные изменениям, обнаруженным на ранних сроках анализа. Гипоксические судороги у молодых крыс значительно повышали экспрессию субъединиц GluN2A и GluN3A в гиппокампе через 2–4 дня после судорог [110]. Пилокарпин-индуцированные судороги вызывают значительное увеличение плотности NMDA-рецепторов в гранулярных клетках зубчатой извилины и пирамидных нейронах поля CA3 гиппокампа. Фармакологические эксперименты показали, что GluN2B-субъединица была ответственна за увеличение возбуждающей активности у этих животных [123]. В модели эпилептогенеза, в которой крысы подвергаются периоду гипертермии и претерпевают дисгенез (холодовое повреждение коры), в латентный период (16–20-е постнатальные дни) наблюдалось усиление NMDA-рецептор-опосредованных вызванных ВПСТ в области CA1 гиппокампа. В двух экспериментальных группах – у крыс, перенесших и дисгенез, и гипертермию, а также у крыс, перенесших только дисгенез, в гиппокампе наблюдалось увеличение экспрессии GluN2B-субъединицы [124].

Несмотря на то, что в различных исследованиях обнаруживается повышение доли GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов после эпилептического статуса, для эпилептизации мозга необходима именно GluN2A-субъединица. Селективная блокада GluN2A-содержащих NMDA-рецепторов нарушала эпилептогенез и разрастание мшистых волокон в пилокарпиновой- и киндлинг-модели лимбической эпилепсии [125]. Снижение экспрессии GluN2A-субъединицы, выявленное в различных областях коры и гиппокампе через неделю после пилокарпин-индуцированных судорог [115], вероятно, является компенсаторным механизмом, направленным на предотвращение эпилептогенеза.

Кроме того, Eyo с соавт., используя двухфотонную визуализацию с высоким разрешением, исследовали NMDA-рецептор-опосредованную регуляцию физических взаимодействий микроглии и нейронов, которые формируются при повышенной глутаматергической нейротрансмиссии. Было обнаружено, что селективный ингибитор GluN2A NVPAAM007, но не ингибитор GluN2B ифенпродил, блокировал возникновение этих взаимодействий. Согласно этим данным, именно GluN2A-субъединица ответственна за обеспечение физических взаимодействий микроглии и нейронов, причем дифференциальная экспрессия данной субъединицы в различных областях мозга обуславливает возможность формирования этих взаимодействий только в определенных структурах мозга. Авторами предполагается, что такие взаимодействия могут иметь важное значение при различных заболеваниях, в частности, при эпилепсии [126].

Таким образом, GluN2A- и GluN2B-содержащие NMDA-рецепторы вносят вклад в патофизиологические изменения, наблюдаемые при эпилептизации мозга. Повышение доли NMDA-рецепторов, включающих GluN2B-субъединицу, может приводить к большему притоку ионов Ca^{2+} в нейроны по сравнению с рецепторами, содержащими GluN2A. За счет этого данный подтип NMDA-рецепторов, вероятно, играет важную роль в запуске гипервозбудимости нейронов [96] и эксайто-

токсичности [127]. В то же время для эпилептогенеза необходима GluN2A-субъединица [125]. Использование различных экспериментальных моделей эпилепсии при анализе роли NMDA-рецепторов в развитии эпилепсии и получение противоречивых результатов различными исследователями затрудняет понимание механизма эпилептогенеза. Однако не вызывает сомнений, что модуляция функционирования NMDA-рецепторов на этапе эпилептизации мозга является перспективным направлением в лечении эпилепсии.

ПРИМЕНЕНИЕ БЛОКАТОРОВ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРИСТУПОВ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗА

Блокаторы NMDA-рецепторов рассматривались в качестве перспективного направления терапии эпилептических приступов [128, 129], однако, из-за сильных побочных эффектов [130–132] их применение в клинике, как правило, ограничено экстренными случаями [133], например, когда пациент демонстрирует фармакорезистентность к препаратам первой линии терапии. Тем не менее, продолжается поиск фармакологических агентов, обладающих меньшими побочными эффектами, равно как и изучаются конкретные механизмы и процессы, запускаемые ранним применением блокаторов NMDA-рецепторов для ослабления или предотвращения эпилептогенеза.

Противосудорожное действие антагонистов NMDA-рецепторов

В настоящее время накоплена большая база экспериментальных исследований, в которых показана высокая противосудорожная эффективность антагонистов NMDA-рецепторов на животных (табл. 2).

Ионы магния являются естественными каналоблокаторами NMDA-рецепторов. Клинические наблюдения и экспериментальные исследования на животных показали, что истощение запасов Mg^{2+} ведет к гипервозбудимости нервной системы, что, в конечном итоге, приводит к появлению эпилептической активности или повышенной восприимчивости к эпилептогенным стимулам [142–144]. Изучение метаболизма Mg^{2+} при эпилепсии позволило установить, что концентрация Mg^{2+} в сыворотке и спинномозговой жидкости пациентов с тонико-клоническими судорогами были значительно ниже, чем в контрольной группе [145, 146]. Концентрация Mg^{2+} в сыворотке и спинномозговой жидкости зависела от продолжительности и частоты эпилептической активности. Искусственное повышение концентрации Mg^{2+} долгое время рассматривалось как эффективное направление терапии. Системное введение Mg^{2+} оказывало противосудорожное действие в моделях эпилептического статуса [147] в случае аудиогенной и пентилентетразол-индуцированной [148–150], а также NMDA-индуцированной активности [151] у грызунов. Недавно было оценено влияние $MgSO_4$ на судороги, вызванные асфиксией у недоношенных плодов овцы. $MgSO_4$ вводился внутривенно в течение 48 ч на сроке гестации 104 дня (полный срок – 147 дней). Применение $MgSO_4$ не предотвращало судороги, но значительно снижало общее число судорог, их тяжесть и пиковую амплитуду эпилептической активности [152]. Дальнейшие исследования необходимы, чтобы установить оптимальную терапевтическую дозу магния для предотвращения судорог, а также чтобы оценить целесообразность его использования в качестве инструмента для подавления эпилептической активности.

Каналоблокаторы являются перспективным инструментом для подавления судорог, поскольку они снижают чрезмерную активность NMDA-рецепторов, не нарушая их нормальной активности. Подобный эффект объясняется тем, что блока-

Таблица 2. Экспериментальные исследования противосудорожного действия антагонистов NMDA-рецепторов
Table 2. Experimental studies of the anticonvulsant effects of NMDA receptor antagonists

Модель Model	Фармакологический агент Pharmacological agent	Временной интервал Time window	Эффект Effect	Ссылки Links
Пентилентет разоловая Pentylenetetra zole	Кетамин, МК-801 Ketamine, MK-801 Мемантин, МК-801 Memantine, MK-801	Вводились заранее Administered in advance Вводились заранее Administered in advance	Повышение порога генерации судорог Increase of seizure threshold Предотвращение клонических и тонических судорог Prevention of clonic and tonic seizures	[134] [135]
Каинатная Kainate	Кетамин, диазепам Ketamine, diazepam	Спустя 90 мин после индукции 90 min after induction	Диазепам отдельно: ослабляет эпилептическую активность, регистируемую на ЭЭГ Кетамин с диазепамом: полностью подавляют эпилептическую активность Diazepam alone: attenuates the EEG registered epileptic activity Ketamine with diazepam: completely suppress epileptic activity	[136]
Зоман-индуцированные судороги Zoman-induced seisures	Кетамин, атропин Ketamine, atropine	Спустя 30 мин после индукции. Эффективность падает, если лечение откладывалось более чем на 1 ч 30 min after induction. The efficiency drops if the treatment was postponed for more than 1 h	Останавливает эпилептическую активность, снижает степень повреждений мозга, обеспечивает выживание Stops epileptic activity, reduces brain damage, ensures survival	[137]
Киндлинг (электрическая стимуляция амигдалы) Kindling (electrical stimulation of amygdala)	L-701,324, фенобарбитал L-701,324, phenobarbital	Субхроническое введение Subchronic administration	Повышение порога генерации судорог Increase of seizure threshold	[138]
Пилокарпиновая Pilocarpine	CI-1041, кетамин CI-1041, ketamine	Через 15 мин после введения пилокарпина 15 min after administration of pilocarpine	CI-1041 и кетамин оказывали нейропротекторное воздействие, кетамин также демонстрировал противосудорожный эффект CI-1041 and ketamine had neuroprotective effects, besides, ketamine demonstrated anticonvulsant effect	[139]
Пикротоксин и понижение внеклеточной концентрации Mg^{2+} (*in vitro*) Picrotoxin and lowered Mg^{2+} extracellular concentration (*in vitro*)	AP5	Добавлялся предварительно Administered in advance	Отсроченное наступление эпилептиформной активности, снижение частоты иктальной активности Delayed onset of epileptiform activity, decreased frequency of ictal activity	[140]
Пилокарпиновая (*in vivo*) Pilocarpine (*in vivo*)	AP5	Спустя 5 дней в течение 2 недель 5 days later within 2 weeks	Отсроченное наступление первых спонтанных судорог, снижение их частоты, уменьшение числа судорог, соответствующих стадиям 3–4 Delayed onset of the first spontaneous seizures, decrease in their frequency, decrease in the number of stage 3–4 seizures	[140]
4-аминопиридин и изменение внеклеточных ионных концентраций (*in vitro*) 4-aminopyridine and changes in ionic extracellular concentrations (*in vitro*)	AP5	–	Подавление иктальных разрядов Suppression of ictal discharges	[141]

торы этого типа предпочтительно воздействуют на чрезмерно открытые ионные каналы, а значит будут эффективнее блокировать патологически активированные рецепторы в отличие от нормально работающих рецепторов. Более того, каналоблокаторы почти не нарушают нормальную синаптической передачу благодаря тому, что скорость их выхода из канала относительно высока [153].

ADCI – селективный низкоафинный каналоблокатор NMDA-рецепторов, совмещающий в себе свойства карбамазепина и MK-801 [154]. Sun и Lin [155] сообщили, что ADCI может также блокировать потенциал-управляемые натриевые каналы в нейронах верхнего шейного ганглия и гиппокампа крыс, а также в культивируемых нейронах NT2 человека. В отличие от других каналоблокаторов, ADCI менее токсичен, это может быть связано с тем, что он сильнее блокирует GluN1A/GluN2B-субъединицы (IC_{50} = 6.6 мкМ), чем GluN1A/GluN2A-субъединицы (IC_{50} = 14.3 мкМ) [154]. ADCI не вызывает гиперлокомоции или стереотипных движений у крыс; при дозах, в 10 раз превышающих ED_{50} в тесте максимального электрошока, ADCI не вызывал нарушений поведения в тесте пассивного избегания и в водном лабиринте Морриса, что указывает на отсутствие нарушений памяти. Препарат также не вызывает вакуолизацию нейронов, наблюдаемую при использовании многих других антагонистов NMDA-рецепторов. ADCI демонстрировал противосудорожный эффект в тесте максимального электрошока [156], а также в отношении эпилептической активности, вызванной 4-аминопиридином, NMDA, пентилентетразолом и кокаином [156–158]; клонических судорог, вызванных дендротоксинами [159]; эпилептической активности, наблюдаемой после отмены этанола у мышей [160].

Низкоаффинный блокатор NMDA-рецепторов кетамин показал свою эффективность в качестве противосудорожного препарата в различных моделях эпилепсии – кетамин влияет на эпилептоподобную активность, вызванную NMDA, гуанидиносукцинатом, п-толуидино-3-пропиламино-2-пропанолом, меркаптопропионатом, N-(3,5-диметокси-4-пропоксифенилэтил)-азиридином, лидокаином, пикротоксином, бикукуллином, стрихнином и пентилентетразолом у грызунов [11, 134, 161–165]. В киндлинговой модели эпилепсии кетамин дозозависимо замедлял наступление 3-й и 4-й стадии по шкале Racine у 15-дневных крыс. Кетамин в дозе 20 мг/кг полностью устранял судорожную активность и почти полностью устранял следовые разряды у ювенильных крыс, подвергшихся киндлингу, что намного эффективнее действия более высоких доз кетамина на взрослых крысах. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что NMDA-рецепторы играют важную роль в повышенной склонности незрелой нервной системы к эпилептической активности [166]. Кетамин способен действовать синергетически с такими антиэпилептическими препаратами, как вальпроат и карбамазепин, ослабляя MES-индуцированные судороги у мышей [167]. Другие исследования продемонстрировали синергетическое действие диазепама и кетамина на эпилептическую активность, вызванную литий-пилокарпином [168] и каинатом [136]. Субанестезирующие дозы кетамина (10 мг/кг) остановили судороги и предотвратили гибель животных, отравленных зоманом; более того, кетамин ослабил повреждающее действие зоман-индуцированной эпилептической активности на ткани мозга и способствовал выживанию [137].

Мемантин и MK-801 успешно предотвращали клонические и тонические судороги, вызванные пентилентетразолом у мышей [135]. В экспериментах на крысах линии Крушинского–Молодкиной оценивался эффект мемантина и ИЭМ-1921, селективных блокаторов NMDA-рецепторов, на аудиогенные судороги. Блокаторы NMDA-рецепторов вводились до подачи звуковых раздражителей. Спустя 30 мин после введения ИЭМ-1921 (5 мг/кг) у 33% крыс обнаружилось полное отсутствие судорог в ответ на звук, а у 59% животных наблюдалось только двигательное возбуждение, не сопровождавшееся генерализированными клонико-тоническими су-

дорогами. Мемантин (5 мг/кг) не полностью подавлял судороги, но у 50% крыс через 1 ч и у 70% крыс через 2 ч после введения наблюдалось ослабление аудиогенных судорог до уровня двигательного возбуждения [169].

Конкурентный антагонист NMDA-рецепторов AP5 (50 мкМ) снижал количество эпилептиформных событий как в зубчатой извилине, так и в области CA1 гиппокампа в переживающих срезах, помещенных в безмагниевый раствор с повышенной концентрацией калия [10]. Эксперименты на изолированном стриатуме, полученном от крысят линии Sprague–Dawley на 7–15-й дни жизни, показали, что стриатум также способен генерировать эпилептиформную активность *in vitro* без участия коры головного мозга и таламуса. AP5 полностью блокировал иктальные разряды и соответствующие им деполяризационные сдвиги, наблюдаемые при регистрации активности срединных шипиковых нейронов стриатума, в то время как агонист AMPA-рецепторов CNQX не влиял ни на амплитуду, ни на длительность эпилептиформной активности, что указывало на NMDA-рецептор-зависимую природу наблюдаемой активности [141]. Антагонист TCN 201 (3 мкМ), специфически блокирующий GluN2A, и аллостерический антагонист Ro 25-6981 (3 мкМ), блокирующий GluN2B, значительно снижали количество эпилептиформных событий при их использовании в концентрациях гораздо более низких, чем концентрация AP5, что дает надежду на клиническое применение антагонистов, специфичных в отношении субъединичного состава рецептора [10]. Антагонист ифенпродил, блокирующий GluN2B, продемонстрировал широкое терапевтическое временное окно (3 дня), снижая восприимчивость к судорогам в тесте максимального электрошока у крыс, перенесших длительные фебрильные судороги [170].

Для подавления эпилептиформной активности также могут быть использованы антагонисты глицин-связывающего сайта NMDA-рецептора, демонстрирующие более благоприятный профиль переносимости по сравнению с антагонистами сайта связывания глутамата [171]. Хотя субхроническое введение антагониста глицин-связывающего сайта L-701,324 не приводило к противосудорожным или модифицирующим эффектам в отношении судорог у киндлированных мышей, L-701,324 улучшил реакцию на фенобарбитал, что выражалось в повышении порога генерации судорог [138].

Основная проблема применения NMDA-антагонистов заключается в том, что именно высокие дозировки, требуемые для эффективного подавления эпилептической активности, приводят к тяжелым побочным эффектам [172, 173]. Применение антагонистов NMDA-рецепторов снижает NMDA-рецептор-опосредованную синаптическую активность, что, даже в случае использования относительно низких доз антагонистов, может приводить к нарушениям памяти и обучаемости. Более тяжелая гипофункция NMDA-рецепторов может быть причиной психоза [130], характеризующегося галлюцинациями, параноидальным бредом, замешательством, снижением концентрации внимания, изменениями настроения, возбуждением, кошмарами, кататонией, атаксией и потерей чувствительности [131, 132]. Применение антагонистов NMDA-рецепторов может запускать нейродегенеративные процессы в цингулярной и ретросплениальной коре головного мозга [174].

Наконец, немаловажной клинической значимостью обладают данные о преимуществе комбинированной терапии (включающей как блокаторы ГАМКа, так и NMDA-рецепторов) над монотерапией в случае бензодеазепам-резистентной эпилептической активности [175]. Применение комбинации блокаторов ГАМКа и NMDA-рецепторов позволило прекратить эпилептическую активность, устойчивую к монотерапии бензодиазепинами или кетамином. Кроме того, одновременное введение мидазолама и кетамина оказалось эффективнее их последовательного применения в той же дозе, это согласуется с представлениями о том, что фармакорезистентность усиливается с течением времени. Комбинированная терапия блокаторами ГАМКа и NMDA-рецепторов была эффективной спустя 40 мин после

начала эпилептической активности как в случае зоман-индуцированной активности, так и в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Также комбинированная терапия повлияла на долгосрочные последствия эпилептической активности, снизив гибель нейронов и ослабив нарушения пространственной памяти [175].

АНТИЭПИЛЕПТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТАГОНИСТОВ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

Эффект D-AP5 на процессы эпилептогенеза был показан *in vitro* и *in vivo*. В переживающих срезах предварительное добавление 1 мкМ D-AP5 отсрочило начало эпилептиформной активности и снизило частоту иктальной активности, вызванных пикротоксином и пониженной концентрацией Mg^{2+}. В экспериментах *in vivo* D-AP5 вводился интрацеребровентрикулярно при помощи осмотического мининасоса спустя 5 дней после индукции эпилептического статуса на протяжении 2 нед., регистрация ЭЭГ продолжалась в течение 2 мес. D-AP5 значительно отсрочил наступление первых спонтанных судорог, вызванных пилокарпином, снизил их частоту, уменьшил число судорог, соответствующих стадиям 3–4. В то же время длительность отдельно взятых периодов спонтанной эпилептической активности не изменилась [140].

Антагонисты NMDA-рецепторов не во всех экспериментах действовали однозначно. Антагонист GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов CI-1041 (10 мг/кг), CP-101,606 – антагонист NMDA-рецепторов, обладающий высокой селективностью в отношении дигетеромеров GluN1/GluN2B (10 мг/кг), а также кетамин были использованы для воздействия на этап индукции эпилептического статуса и последующую нейродегенерацию в пилокарпиновой модели эпилепсии. Растворы антагонистов вводились внутрибрюшинно через 15 мин после введения пилокарпина. Кетамин снижал интенсивность устойчивого орофасциального автоматизма, жевания и клонуса передних конечностей, но не восстанавливал выпрямительный рефлекс. Однако применение CI-1041 или CP-101,606 не повлияло на поведенческий паттерн эпилептического статуса. Введение CP-101,606 также не повлияло на интенсивность нейродегенерации в области CA1 гиппокампа, в зубчатой извилине и амигдале на 7-е сутки после введения пилокарпина. В то же время CI-1041 и кетамин снижали нейродегенерацию, наблюдаемую в гиппокампе и миндалине, что указывает на нейропротекторный эффект CI-1041 при отсутствии эффекта на судорожную активность [139]. NBQX, антагонист AMPA-рецепторов, и антагонист NMDA-рецепторов ифенпродил были использованы для предотвращения эпилептогенеза у мышей [176]. Комбинация двух антагонистов вводилась в течение 5 сут, спустя 6 ч после внутригиппокампальной инъекции каината. Через две недели после введения каината у мышей, получающих терапию, наблюдалось меньшее число спонтанных судорог по сравнению с контрольной группой, однако, этот эффект был утрачен в последующие недели. Применение NBQX и ифенпродила временно предотвращало рассеивание гранулярных клеток и сопровождалось гибелью меньшего числа нейронов в зубчатой извилине. Также сообщалось, что введение MK-801 предотвращало повреждение мозговых структур вне зависимости от его противосудорожного действия. Однократное введение низкой дозы MK-801 после того, как эпилептический статус, индуцированный каинатом, уже был остановлен введением диазепама, позволило предотвратить большую часть повреждений головного мозга. Наиболее выраженный нейропротекторный эффект MK-801 наблюдался в передней части дорсального гиппокампа, а областями, на которые MK-801 не оказал нейропротекторного воздействия, были ворота зубчатой извилины и сетчатая часть черной субстанции. Несмотря на это, однократное введение MK-801 не препятствовало развитию спонтанных судорог [177]. Отчасти нейропротекторный

эффект МК-801 может объясняться тем, что МК-801 способен блокировать перекисное окисление липидов, индуцированное хинолиновой кислотой в крысином стриатуме. Поскольку основной механизм нейротоксического действия хинолиновой кислоты связан с чрезмерной активацией NMDA-рецепторов, нейропротекторный эффект МК-801 в этом случае, скорее всего, опосредован NMDA-рецепторами [178]. Более длительное применение антагонистов требуется, чтобы уточнить взаимосвязь между дегенеративными изменениями и развитием спонтанных судорог.

Исследования эпилептогенеза на животных позволили выявить новые мишени для терапии, связанные с активностью NMDA-рецепторов. Нокдаун белка Nwd1 оказывает противосудорожное действие, аналогичное действию противоэпилептических препаратов. Подавление Nwd1 *in vitro* с помощью аденоассоциированных вирусов ведет к ослаблению возбуждающих постсинаптических токов, опосредованных GluN2B-содержащими NMDA-рецепторами, в переживающих срезах гиппокампа. Подавление Nwd1 снижает гипервозбудимость нейронов и уменьшает вероятность возникновения эпилептической активности в ходе каинат-индуцированного эпилептического статуса. Более того, повышенный уровень экспрессии Nwd1 в тканях мозга наблюдался не только у мышей с каинат-индуцированными судорогами, но и у пациентов с эпилепсией височной доли [179].

Регулировать работу NMDA-рецепторов способен также белок σ1R. Кальций-зависимое связывание σ1-рецептора с GluN1-субъединицей NMDA-рецепторов, несущей цитозольный сегмент C1, защищает активность NMDA-рецепторов, а именно вход кальция, от ингибирующего действия кальций-активированного кальмодулина. В то время как агонисты σ1-рецептора способствуют его связыванию с субъединицей GluN1, его антагонисты разрушают эти комплексы, способствуя ингибированию работы NMDA-рецепторов. Каннабидиол, являющийся антагонистом σ1-рецептора, снижал частоту эпилептической активности, вызванной интрацеребровентрикулярным введением NMDA [180]. Также введение каннабидиола приводило к тому, что меньшее количество мышей демонстрировало гипермобильность и клонические судороги. Тонические судороги наблюдались только у 20% мышей, и ни одна мышь не погибла. В присутствии PPCC, агониста σ1-рецептора, каннабидиол прекращал оказывать модулирующее действие на NMDA-индуцированную активность, что свидетельствует о существовании фунциональных связей между σ1-рецепторами и NMDA-рецепторами [180].

Недавно было обнаружено, что у пациентов с эпилепсией и у животных, у которых эпилептическая активность вызывалась экспериментально, повышена экспрессия рецептора GPR40, принадлежащего к семейству рецепторов, сопряженных с G-белком. С использованием двух моделей эпилепсии удалось установить, что активация GPR40 облегчает судороги, вызванные каинатом, а в отношении животных, получавших инъекции пентилентетразола в ходе киндлинга, активация GPR40 снижала подверженность животных к судорогам. Регистрация синаптической активности методом пэтч-кламп показала, что GPR40 влияет на NMDA-рецептор-опосредованную синаптическую передачу. Амплитуда NMDA-рецептор-опосредованных ВПСТ снижалась в присутствии GW9508, селективного агониста GPR40, и увеличивалась в присутствии GW1100 – селективного антагониста GPR40. Напротив, AMPA-рецептор-опосредованные ВПСТ не изменились в присутствии GW9508 и GW1100. Кроме того, GPR40 регулировал поверхностную экспрессию GluN2A и GluN2B [181]. Таким образом, GPR40 способен модулировать эпилептическую активность и является потенциальной мишенью для терапевтического вмешательства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпилепсия зачастую сопровождается дисрегуляцией NMDA-рецепторов, что делает эти рецепторы перспективной терапевтической мишенью. Несмотря на кажущуюся привлекательность применения антагонистов NMDA-рецепторов для подавления судорог, результаты проведенных исследований на животных оказались противоречивыми. Применение антагонистов NMDA-рецепторов сопровождалось рядом побочных эффектов, таких как: нейродегенеративные изменения в цингулярной и ретросплениальной коре [174], психотомиметические эффекты [182], ухудшение обучаемости [183]. Минимум побочных эффектов вызывало применение антагонистов глицинового сайта и конкурентных антагонистов, в то время как использование высокоаффинных антагонистов открытого состояния канала приводило к обширному спектру нарушений.

Снизить смертность и вероятность развития эпилепсии можно, обеспечив более эффективное лечение эпилептического статуса. Уточнение рекомендаций по терапии эпилептического статуса, основанное на накопленных данных о наблюдаемых в ходе эпилептического статуса изменениях синаптической передачи, сокращение временного промежутка между манифестацией заболевания и началом терапевтического вмешательства, а также раннее использование политерапии потенциально могут быть использованы для предотвращения эпилептогегеза и являются перспективными направлениями лечения эпилепсии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90122 (Ю.Л. Ергина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Berg A.T., Berkovic S.F., Brodie M.J., Buchhalter J., Cross J.H., van Emde Boas W., Engel J., French J., Glauser T.A., Mathern G.W., Moshé S.L., Nordli D., Plouin P., Scheffer I.E.* Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. Epilepsia. 51(4): 676–685. 2010.
2. *Sharm A.K., Reams R.Y., Jordan W.H., Miller M.A., Thacker H.L., Snyder P.W.* Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. Toxicol. Pathol. 35(7): 984–999. 2007.
3. *Herman S.T.* Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. Neurology. 59(9) Suppl 5: S21–S26. 2002.
4. *Anderson G.D., Temkin N.R., Chandler W.L.,Winn H.R.* Effect of valproate on hemostatic function in patients with traumatic brain injury. Epilepsy Res. 57(2–3): 111–119. 2003.
5. *Chang B.S., Lowenstein D.H.* Epilepsy. N. Engl. J. Med. 349(13): 1257–1266. 2003.
6. *Altındağ E., Erdoğan F.F., Tezer İ., Özkara Ç.* Management and Early Treatment of Status Epilepticus in Adults and Children. Turkish J. Neurol. 23(4): 155–161. 2017.
7. *Betjemann J.P., Lowenstein D.H.* Status epilepticus in adults. Lancet Neurol. 14(6): 615–624. 2015.
8. *Bayer T.A., Wiestler O.D., Wolf H.K.* Hippocampal loss of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 mRNA in chronic temporal lobe epilepsy. Acta Neuropathol. 89(5): 446–450. 1995.
9. *Mathern G.W., Leite J.P., Babb T.L., Pretorius J.K., Kuhlman P.A., Mendoza D., Fried I., Sakamoto A.C., Assirati J.A., Adelson P.D., Peacock W.J.* Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. Neuroreport. 7(5): 1029–1035. 1996.
10. *Punnakkal P., Dominic D.* NMDA Receptor GluN2 Subtypes Control Epileptiform Events in the Hippocampus. Neuromolec. Med. 20(1): 90–96. 2018.
11. *Kubová H., Mares P.* Effects of MK-801 (dizocilpine) and ketamine on strychnine-induced convulsions in rats: comparison with benzodiazepines and standard anticonvulsants. Physiol. Res. 43(5): 313–320. 1994.
12. *Laube B., Kuhse J., Betz H.* Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. J. Neurosci. 18(8): 2954–2961. 1998.
13. *Mano I., Teichberg V.I.* A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. Neuroreport. 9(2): 327–331. 1998.

14. *Sobolevsky A.I., Rosconi M.P., Gouaux E.* X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. Nature. 462(7274): 745–756. 2009.
15. *Ayalon G., Segev E., Elgavish S., Stern-Bach Y.* Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. J. Biol. Chem. 280(15): 15053–15060. 2005.
16. *Hansen K.B., Yi F., Perszyk R.E., Furukawa H., Wollmuth L.P., Gibb A.J., Traynelis S.F.* Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. J. Gen. Physiol. 150(8): 1081–1105. 2018.
17. *Ulbrich M.H., Isacoff E.Y.* Subunit counting in membrane-bound proteins. Nat. Methods. 4(4): 319–321. 2007.
18. *Ulbrich M.H., Isacoff E.Y.* Rules of engagement for NMDA receptor subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105(37): 14163–14168. 2008.
19. *Forrest D., Yuzaki M., Soares H.D., Ng L., Luk D.C., Sheng M., Stewart C.L., Morgan J.I., Connor J.A., Curran T.* Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. Neuron. 13(2): 325–338. 1994.
20. *Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R.* Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. Pharmacol. Rev. 62(3): 405–496. 2010.
21. *Regan M.C., Romero-Hernandez A., Furukawa H.* A structural biology perspective on NMDA receptor pharmacology and function. Current Opin. Struct. Biol. 33: 68–75. 2015.
22. *Punnakkal P., Jendritza P., Köhr G.* Influence of the intracellular GluN2 C-terminal domain on NMDA receptor function. Neuropharmacology. 62(5–6): 1985–1992. 2012.
23. *Maki B.A., Aman T.K., Amico-Ruvio S.A., Kussius C.L., Popescu G.K.* C-terminal domains of N-methyl-D-aspartic acid receptor modulate unitary channel conductance and gating. J. Biol. Chem. 287(43): 36071–36080. 2012.
24. *Sheng M., Cummings J., Roldan L.A., Jan Y.N., Jan L.Y.* Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. Nature. 368(6467): 144–147. 1994.
25. *Dunah A.W., Luo J., Wang Y.H., Yasuda R.P., Wolfe B.B.* Subunit composition of N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system that contain the NR2D subunit. Mol. Pharmacol. 53(3): 429–437. 1998.
26. *Dunah A.W., Standaert D.G.* Subcellular segregation of distinct heteromeric NMDA glutamate receptors in the striatum. J. Neurochem. 85(4): 935–943. 2003.
27. *Rauner C., Köhr G.* Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. J. Biol. Chem. 286(9): 7558–7566. 2011.
28. *Tovar K.R., McGinley M.J., Westbrook G.L.* Triheteromeric NMDA receptors at hippocampal synapses. J. Neurosci. 33(21): 9150–9160. 2013.
29. *Johnson J.W., Ascher P.* Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature. 325(6104): 529–531. 1987.
30. *Furukawa H., Singh S.K., Mancusso R., Gouaux E.* Subunit arrangement and function in NMDA receptors. Nature. 438(7065): 185–192. 2005.
31. *Yao Y., Harrison C.B., Freddolino P.L., Schulten K., Mayer M.L.* Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. EMBO J. 27(15): 2158–2170. 2008.
32. *Pullan L.M., Olney J.W., Price M.T., Compton R.P., Hood W.F., Michel J., Monahan J.B.* Excitatory amino acid receptor potency and subclass specificity of sulfur-containing amino acids. J. Neurochem. 49(4): 1301–1307. 1987.
33. *McBain C.J., Kleckner N.W., Wyrick S., Dingledine R.* Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in Xenopus oocytes. Mol. Pharmacol. 36(4): 556–565. 1989.
34. *Panatier A., Theodosis D.T., Mothet J., Touquet B., Pollegioni L., Poulain D.A., Oliet S.H.R.* Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. Cell. 125(4): 775–784. 2006.
35. *Wolosker H., Blackshaw S., Snyder S.H.* Serine racemase: A glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(23): 13409–13414. 1999.
36. *Balu D.T., Takagi S., Puhl M.D., Benneyworth M.A., Coyle J.T.* D-serine and serine racemase are localized to neurons in the adult mouse and human forebrain. Cell. Mol. Neurobiol. 34(3): 419–435. 2014.
37. *Miya K., Inoue R., Takata Y., Abe M., Natsume R., Sakimura K., Hongou K., Miyawaki T., Mori H.* Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. J. Compar. Neurol. 510(6): 641–654. 2008.
38. *Benveniste H.* Brain microdialysis. J. Neurochem. 52(6): 1667–1679. 1989.
39. *Zhang X., Nadler J.V.* Postsynaptic response to stimulation of the Schaffer collaterals with properties similar to those of synaptosomal aspartate release. Brain Res. 1295: 13–20. 2009.

40. *Do K.Q., Herrling P.L., Streit P., Turski W.A., Cuenod M.* In vitro release and electrophysiological effects in situ of homocysteic acid, an endogenous N-methyl-(D)-aspartic acid agonist, in the mammalian striatum. J. Neurosci. 6(8): 2226–2234. 1986.
41. *Yuzaki M., Connor J.A.* Characterization of L-homocysteate-induced currents in Purkinje cells from wild-type and NMDA receptor knockout mice. J. Neurophysiol. 82(5): 2820–2826. 1999.
42. *Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B., Seeburg P.H.* Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. Science. 256(5060): 1217–1221. 1992.
43. *Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H.* Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron. 12(3): 529–540. 1994.
44. *Akazawa C., Shigemoto R., Bessho Y., Nakanishi S., Mizuno N.* Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. J. Compar. Neurol. 347(1): 150–160. 1994.
45. *Zhong J., Carrozza D.P., Williams K., Pritchett D.B., Molinoff P.B.* Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain. J. Neurochem. 64(2): 531–539. 1995.
46. *Erreger K., Geballe M.T., Kristensen A., Chen P.E., Hansen K.B., Lee C.J., Yuan H., Le P., Lyuboslavsky P.N., Micale N., Jørgensen L., Clausen R.P., Wyllie D.J.A., Snyder J.P., Traynelis S.F.* Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. Mol. Pharmacol. 72(4): 907–920. 2007.
47. *Chen P.E., Geballe M.T., Katz E., Erreger K., Livesey M.R., O'Toole K.K., Le P., Lee C.J., Snyder J.P., Traynelis S.F., Wyllie D.J.A.* Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in Xenopus laevis oocytes. J. Physiol. 586(1): 227–245. 2008.
48. *Hansen K.B., Bräuner-Osborne H., Egebjerg J.* Pharmacological characterization of ligands at recombinant NMDA receptor subtypes by electrophysiological recordings and intracellular calcium measurements. Comb. Chem. High Throughput Screen. 11(4): 304–315. 2008.
49. *Lester R.A.J., Clements J.D., Westbrook G.L., Jahr C.E.* Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. Nature. 346(6284): 565–567. 1990.
50. *Vicini S., Wang J.F., Li J.H., Zhu W.J., Wang Y.H., Luo J.H., Wolfe B.B., Grayson D.R.* Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. J. Neurophysiol. 79(2): 555–566. 1998.
51. *Erreger K., Chen P.E., Wyllie D.J.A., Traynelis S.F.* Glutamate receptor gating. Crit. Rev. Neurobiol. 16(3): 187–224. 2004.
52. *Glasgow N.G., Siegler- Retchless B., Johnson J.W.* Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties. J. Physiol. 593(1): 83–95. 2015.
53. *Yuan H., Geballe M.T., Hansen K.B, Traynelis S.F.* Structure and Function of the NMDA Receptor. In: Structural And Functional Organization of the Synapse. Eds. *J.W. Hell, M.D. Ehlers*. Boston. MA. Springer. 289–316. 2008.
54. *Burnashev N., Zhou Z., Neher E., Sakmann B.* Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. J. Physiol. 485(2): 403–418. Jun. 1995.
55. *Jatzke C., Watanabe J., Wollmuth L.P.* Voltage and concentration dependence of Ca(2+) permeability in recombinant glutamate receptor subtypes. J. Physiol. 538(1): 25–39. 2002.
56. *Siegler Retchless B., Gao W., Johnson J.W.* A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction. Nat. Neurosci. 15(3): 406–413. S1-2. 2012.
57. *Kuner T., Schoepfer R.* Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg^{2+} block in NMDA receptor channels. J. Neurosci. 16(11): 3549–3558. 1996.
58. *Nevian T., Sakmann B.* Single spine Ca^{2+} signals evoked by coincident EPSPs and backpropagating action potentials in spiny stellate cells of layer 4 in the juvenile rat somatosensory barrel cortex. J. Neurosci. 24(7): 1689–1699. 2004.
59. *Nevian T., Sakmann B.* Spine Ca2+ signaling in spike-timing-dependent plasticity. J. Neurosci. 26(43): 11001–11013. 2006.
60. *Carter B.C., Jahr C.E.* Postsynaptic, not presynaptic NMDA receptors are required for spike-timing-dependent LTD induction. Nat. Neurosci. 19(9): 1218–1224. 2016.
61. *Tomek S.E., Lacrosse A.L., Nemirovsky N.E., Olivev M.F.* NMDA Receptor Modulators in the Treatment of Drug Addiction. Pharmaceuticals (Basel). 6(2): 251–268. 2013.
62. *Croucher M.J., Collins J.F., Meldrum B.S.* Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. Science. 216(4548): 899–901. 1982.
63. *Patel S., Chapman A.G., Graham J.L., Meldrum B.S., Frey P.* Anticonvulsant activity of the NMDA antagonists, D(-)4-(3-phosphonopropyl)-piperazine-2-carboxylic acid (D-CPP) and D(-)(E)-4-(3-phosphonoprop-2-enyl)-piperazine-2-carboxylic acid (D-CPPene) in a rodent and a primate model of reflex epilepsy. Epilepsy Res. 7(1): 3–10. 1990.

64. *Burnell E.S., Irvine M., Fang G., Sapkota K., Jane D.E., Monaghan D.T.* Positive and Negative Allosteric Modulators of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptors: Structure-Activity Relationships and Mechanisms of Action. J. Med. Chem. 62(1): 3–23. 2019.
65. *Ogden K.K., Traynelis S.F.* New advances in NMDA receptor pharmacology. Trends Pharmacol. Sci. 32(12): 726–733. 2011.
66. *Karakas E., Simorowski N., Furukawa H.* Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. Nature. 475(7355): 249–253. 2011.
67. *Karakas E., Furukawa H.* Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. Science. 344(6187): 992–997. 2014.
68. *Stroebel D., Buhl D.L., Knafels J.D., Chanda P.K., Green M., Sciabola S., Mony L., Paoletti P., Pandit J.* A Novel Binding Mode Reveals Two Distinct Classes of NMDA Receptor GluN2B-selective Antagonists. Mol. Pharmacol. 89(5): 541–551. 2016.
69. *Burger P.B., Yuan H., Karakas E., Geballe M., Furukawa H., Liotta D.C., Snyder J.P., Traynelis S.F.* Mapping the binding of GluN2B-selective N-methyl-D-aspartate receptor negative allosteric modulators. Mol. Pharmacol. 82(2): 344–359. 2012.
70. *Romero-Hernandez A., Simorowski N., Karakas E., Furukawa H.* Molecular Basis for Subtype Specificity and High-Affinity Zinc Inhibition in the GluN1-GluN2A NMDA Receptor Amino-Terminal Domain. Neuron. 92(6): 1324–1336. 2016.
71. *Parsons C.G., Quack G., Bresink I., Baran L., Przegalinski E., Kostowski W., Krzascik P., Hartmann S., Danysz W.* Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. Neuropharmacology. 34(10): 1239–1258. 1995.
72. *Benveniste M., Mayer M.L.* Trapping of glutamate and glycine during open channel block of rat hippocampal neuron NMDA receptors by 9-aminoacridine. J. Physiol. 483(2): 367–384. 1995.
73. *Bolshakov K.V., Gmiro V.E., Tikhonov D.B., Magazanik L.G.* Determinants of trapping block of N-methyl-d-aspartate receptor channels. J. Neurochem. 87(1): 56–65. 2003.
74. *Barygin O.I., Gmiro V.E., Kim K.K., Magazanik L.G., Tikhonov D.B.* Blockade of NMDA receptor channels by 9-aminoacridine and its derivatives. Neurosci. Lett. 451(1): 29–33. 2009.
75. *Blanpied T.A., Boeckman F.A., Aizenman E., Johnson J.W.* Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. J. Neurophysiol. 77(1): 309–323. 1997.
76. *Kotermanski S.E., Wood J.T., Johnson J.W.* Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping. J. Physiol. 587(19): 4589–4604. 2009.
77. *Johnson J.W., Glasgow N.G., Povysheva N.V.* Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. Curr. Opin. Pharmacol. 20: 54–63. 2015.
78. *Sobolevsky A.I., Yelshansky M.V.* The trapping block of NMDA receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurones. J. Physiol. 526(3): 493–506. 2000.
79. *Poulsen M.H., Andersen J., Christensen R., Hansen K.B., Traynelis S.F., Strømgaard K., Kristensen A.S.* Binding of ArgTX-636 in the NMDA receptor ion channel. J. Mol. Biol. 427 (1): 176–189. 2015.
80. *Takahashi H., Xia P., Cui J., Talantova M., Bodhinathan K., Li W., Saleem S., Holland E.A., Tong G., Piña-Crespo J., Zhang D., Nakanishi N., Larrick J.W., McKercher S.R., Nakamura T., Wang Y., Lipton S.A.* Pharmacologically targeted NMDA receptor antagonism by NitroMemantine for cerebrovascular disease. Sci. Rep. 5: 14781. 2015.
81. *Hamilton N.B., Attwell D.* Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? Nat. Rev. Neurosci. 11(4): 227–238. 2010.
82. *Duan S., Anderson C.M., Keung E.C., Chen Y., Chen Y., Swanson R.A.* P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. J. Neurosci. 23(4): 1320–1328. 2003.
83. *Malarkey E.B., Parpura V.* Mechanisms of glutamate release from astrocytes. Neurochem. Int. 52(1–2): 142–154. 2008.
84. *Szatkowski M., Barbour B., Attwell D.* Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. Nature. 348(6300): 443–446. 1990.
85. *Nicholls D., Attwell D.* The release and uptake of excitatory amino acids. Trends Pharmacol. Sci. 11(11): 462–468. 1990.
86. *Hardingham G.E., Bading H.* Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. Biochim. Biophys. Acta. 1600(1–2): 148–153. 2002.
87. *Tu W., Xu X., Peng L., Zhong X., Zhang W., Soundarapandian M.M., Balel C., Wang M., Jia N., Zhang W., Lew F., Chan S.L., Chen Y., Lu Y.* DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. Cell. 140(2): 222–234. 2010.
88. *Wroge C.M., Hogins J., Eisenman L., Mennerick S.* Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. J. Neurosci. 32(19): 6732–6742. 2012.
89. *Sattler R., Xiong Z., Lu W.Y., Hafner M., MacDonald J.F., Tymianski M.* Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. Science. 284(5421): 1845–1848. 1999.

90. *Tajima N., Karakas E., Grant T., Simorowski N., Diaz-Avalos R., Grigorieff N., Furukawa H.* Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. Nature. 534(7605): 63–68. 2016.
91. *Ahmadirad N., Shojaei A., Javan M., Pourgholami M.H., Mirnajafi-Zadeh J.* Effect of minocycline on pentylenetetrazol-induced chemical kindled seizures in mice. Neurol. Sci. 35(4): 571–576. 2014.
92. *Davoudi M., Shojaei A., Palizvan M.R., Javan M., Mirnajafi-Zadeh J.* Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. Epilepsy Res. 106(1–2): 54–63. 2013.
93. *Lopes M.W., Soares F.M.S., de Mello N., Nunes J.C., Cajado A.G., de Brito D., de Cordova F.M., da Cunha R.M.S., Walz R., Leal R.B.* Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. Exp. Brain Res. 226(2): 153–163. 2013.
94. *Zubareva O.E., Kovalenko A.A., Karyakin V.B., Kalemenev S.V., Lavrent'eva V.V., Magazanik L.G., Zaitsev A.V.* Changes in the Expression of Genes of the Glutamate Transporter and Subunits of the NMDA and AMPA Receptors in the Rat Amygdala in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy. Neurochem. J. 12(3): 222–227. 2018.
95. *di Maio R., Mastroberardino P.G., Hu X., Montero L.M., Greenamyre J.T.* Pilocapine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. Neurobiol. Dis. 42(3): 482–95. 2011.
96. *di Maio R., Mastroberardino P.G., Hu X., Montero L.M., Greenamyre J.T.* Thiol oxidation and altered NR2B/NMDA receptor functions in in vitro and in vivo pilocarpine models: implications for epileptogenesis. Neurobiol. Dis. 49: 87–98. 2013.
97. *Alsharafi W.A., Xiao B., Li J.* MicroRNA-139-5p negatively regulates NR2A-containing NMDA receptor in the rat pilocarpine model and patients with temporal lobe epilepsy. Epilepsia. 57(11): 1931–1940. 2016.
98. *Müller L., Tokay T., Porath K., Köhling R., Kirschstein T.* Enhanced NMDA receptor-dependent LTP in the epileptic CA1 area via upregulation of NR2B. Neurobiol. Dis. 54: 183–193. 2013.
99. *Postnikova T.Y., Zubareva O.E., Kovalenko A.A., Kim K.K., Magazanik L.G., Zaitsev A.V.* Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors. Biochemistry. 82(3): 282-290. 2017.
100. *Alinaghipour A., Mazoochi T., Ardjmand A.* Low-dose ethanol ameliorates amnesia induced by a brief seizure model: the role of NMDA signaling. Neurol. Res. 41(7): 624–632. 2019.
101. *Wang W.-P., Lou Y., Li Z.-Z., Li P., Duan R.-S.* Change of hippocampal NMDA receptor and emotional behavior and spatial learning and memory in status epilepticus rat model. Chinese J. Appl. Physiol. 23(1): 51–55. 2007.
102. *Zhu X., Dong J., Shen K., Bai Y., Zhang Y., Xuan L., Chao J., Yao H.* NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress. Brain Res. Bull. 114: 70–78. 2015.
103. *Lasoń W., Turchan J., Przewłocka B., Łabuz D., Machelska H., Przewłocki R.* Effects of pentylenetetrazol kindling on glutamate receptor genes expression in the rat hippocampus. Brain Res. 785(2): 355–358. 1998.
104. *Gori M.B., Girardi E.* 3-Mercaptopropionic acid-induced repetitive seizures increase glun2a expression in rat hippocampus: A potential neuroprotective role of cyclopentyladenosine. Cell. Mol. Neurobiol. 33(6): 803–813. 2013.
105. *Girardi E., Auzmendi J., Charó N., Gori M.B., Castro M.* 3-Mercaptopropionic Acid-Induced Seizures Decrease NR2B Expression in Purkinje Cells: Cyclopentyladenosine Effect. Cell. Mol. Neurobiol. 30(7): 985–990. 2010.
106. *Auzmendi J., González N., Girardi E.* The NMDAR subunit NR2B expression is modified in hippocampus after repetitive seizures. Neurochem. Res. 34(5): 819–826. 2009.
107. *Zhu L.-J., Chen Z., Zhang L.-S., Xu S.-J., Xu A.-J., Luo J.-H.* Spatiotemporal changes of the N-methyl-d-aspartate receptor subunit levels in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. Neurosci. Lett. 356(1): 53–56. 2004.
108. *Peng W.-F., Ding J., Li X., Fan F., Zhang Q.-Q.,Wang X.* N-methyl-d-aspartate receptor NR2B subunit involved in depression-like behaviours in lithium chloride-pilocarpine chronic rat epilepsy model. Epilepsy Res. 119: 77–85. 2016.
109. *Lasón W., Turchan J., Przewłocki R., Machelska H., Labuz D., Przewłocka B.* Effects of pilocarpine and kainate-induced seizures on N-methyl-D-aspartate receptor gene expression in the rat hippocampus. Neuroscience. 78(4): 997–1004. 1997.
110. *Zhou C., Sun H., Klein P.M., Jensen F.E.* Neonatal seizures alter NMDA glutamate receptor GluN2A and 3A subunit expression and function in hippocampal CA1 neurons. Front. Cell. Neurosci. 9: 362. 2015.
111. *Curia G., Longo D., Biagini G., Jones R.S.G., Avoli M.* The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Methods. 172(2): 143–157. 2008.

112. *Lévesque M., Avoli M.* The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. Neurosci. Biobehav. Rev. 37(10): 2887–2899. 2013.
113. *Dalby N.O., Mody I.* The process of epileptogenesis: A pathophysiological approach. Current Opin. Neurol. 14(2): 187–192. 2001.
114. *Pitkänen A., Sutula T.P.* Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. Lancet Neurol. 1(3): 173–181. 2002.
115. *Zubareva O.E., Kovalenko A.A., Kalemenev S.V., Schwarz A.P., Karyakin V.B., Zaitsev A. V.* Alterations in mRNA expression of glutamate receptor subunits and excitatory amino acid transporters following pilocarpine-induced seizures in rats. Neurosci. Lett. 686: 94–100. 2018.
116. *Ehlers M.D., Tingley W.G., Huganir R.L.* Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. Science. 269(5231): 1734–1737. 1995.
117. *Tingley W.G., Ehlers M.D., Kameyama K., Doherty C., Ptak J.B., Riley C.T., Huganir R.L.* Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. J. Biol. Chem. 272(8): 5157–5166. 1997.
118. *Crump F.T., Dillman K.S.,Craig A.M.* cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. J. Neurosci. 21(14): 5079–5088. 2001.
119. *Fong D.K., Rao A., Crump F.T., Craig A.M.* Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: Reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. J. Neurosci. 22(6): 2153–2164. 2002.
120. *Ehlers M.D., Zhang S., Bernhardt J.P., Huganir R.L.* Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. Cell. 84(5): 745–755. 1996.
121. *Hisatsune C., Umemori H., Inoue T., Michikawa T., Kohda K., Mikoshiba K., Yamamoto T.* Phosphorylation-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calmodulin. J. Biol. Chem. 272(33): 20805–20810. 1997.
122. *Ryu H.J., Kim J.E., Yeo S.I., Kim D.S., Kwon O.S., Choi S.Y.* Potential roles of D-serine and serine racemase in experimental temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Res. 88(11): 2469–2482. 2010.
123. *Naylor D.E., Liu H., Niquet J., Wasterlain C.G.* Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. Neurobiol. Dis. 54: 225–238. 2013.
124. *Ouardouz M., Lema P., Awad P.N., di Cristo G., Carmant L.* N-methyl-d-aspartate, hyperpolarization-activated cation current (I h) and -aminobutyric acid conductances govern the risk of epileptogenesis following febrile seizures in rat hippocampus. Eur. J. Neurosci. 31(7): 1252–1260. 2010.
125. *Chen Q., He S., Hu X.L., Yu J., Zhou Y., Zheng J., Zhang S., Zhang C., Duan W.H., Xiong Z.Q.* Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Activity-Dependent Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Regulation and Limbic Epileptogenesis. J. Neurosci. 27(3): 542–552. 2007.
126. *Eyo U.B., Bispo A., Liu J., Sabu S., Wu R., Dibona V.L., Zheng J., Murugan M., Zhang H., Tang Y., Wu L.J.* The GluN2A Subunit Regulates Neuronal NMDA receptor-Induced Microglia-Neuron Physical Interactions. Sci. Rep. 8(1): 828. 2018.
127. *Wu Y., Chen C., Yang Q., Jiao M., Qiu S.* Endocytosis of GluN2B-containing NMDA receptor mediates NMDA-induced excitotoxicity. Mol. Pain. 13: 1744806917701921. 2017.
128. *Bertram E.H., Lothman E.W.* NMDA receptor antagonists and limbic status epilepticus: a comparison with standard anticonvulsants. Epilepsy Res. 5(3): 177–184. 1990.
129. *Rogawski M.A.* The NMDA receptors. NMDA antagonists and epilepsy therapy. Drugs. 44(3): 279–292. 1992.
130. *Farber N.B.* The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1003: 119–130. 2003.
131. *Muir K.W., Lees K.R.* Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. Stroke. 26(3): 503–513. 1995.
132. *Gouzoulis-Mayfrank E., Heekeren K., Neukirch A., Stoll M., Stock C., Obradovic M., Kovar K.A.* Psychological effects of (S)-ketamine and N,N-dimethyltryptamine (DMT): a double-blind, cross-over study in healthy volunteers. Pharmacopsychiatry. 38(6): 301–311. 2005.
133. *Zeiler F.A.* Early Use of the NMDA Receptor Antagonist Ketamine in Refractory and Super-refractory Status Epilepticus. Crit. Care Res. Pract. 2015: 831260. 2015.
134. *Ghasemi M., Shafaroodi H., Nazarbeiki S., Meskar H., Heydarpour P., Ghasemi A., Talab S.S., Ziai P., Bahremand A., Dehpour A.R.* Voltage-dependent calcium channel and NMDA receptor antagonists augment anticonvulsant effects of lithium chloride on pentylenetetrazole-induced clonic seizures in mice. Epilepsy Behav. 18(3): 171–178. 2010.
135. *Lukomskaya N.Y., Rukoyatkina N.I., Gorbunova L.V., Magazanik L.G., Gmiro V.E.* Studies of the roles of NMDA and AMPA glutamate receptors in the mechanism of corasole convulsions in mice. Neurosci. Behav. Physiol. 34(8): 783–789. 2004.
136. *Vermoesen K., Smolders I., Massie A., Michotte Y., Clinckers R.* The control of kainic acid-induced status epilepticus. Epilepsy Res. 90(1–2): 164–166. 2010.

137. *Dorandeu F., Carpentier P., Baubichon D., Four E., Bernabé D., Burckhart M.F., Lallement G.* Efficacy of the ketamine-atropine combination in the delayed treatment of soman-induced status epilepticus. Brain Res. 1051(1–2): 164–175. 2005.
138. *Zellinger C., Salvamoser J.D., Soerensen J., van Vliet E.A., Aronica E., Gorter J., Potschka H.* Pre-treatment with the NMDA receptor glycine-binding site antagonist L-701,324 improves pharmacosensitivity in a mouse kindling model. Epilepsy Res. 108(4): 634–643. 2014.
139. *Loss C.M., da Rosa N.S., Mestriner R.G., Xavier L.L.,Oliveira D.L.* Blockade of GluN2B-containing NMDA receptors reduces short-term brain damage induced by early-life status epilepticus. Neurotoxicology. 71: 138–149. 2019.
140. *Clasadonte J., Dong J., Hines D.J., Haydon P.G.* Astrocyte control of synaptic NMDA receptors contributes to the progressive development of temporal lobe epilepsy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110(43): 17540–17545. 2013.
141. *Yu W., Calos M., Pilitsis J., Shin D.S.H.* Deconstructing the neural and ionic involvement of seizure-like events in the striatal network. Neurobiol. Dis. 52: 128–136. 2013.
142. *Hanna S., Harrison M., Macintyre I., Fraser R.* The syndrome of magnesium deficiency in man. Lancet. 276(7143): 172–176. 1960.
143. *Buck D.R., Mahoney A.W., Hendricks D.G.* Effect of magnesium deficiency on nonspecific excitability level (NEL) and audiogenic seizure susceptibility. Pharmacol. Biochem. Behav. 5(5): 529–534. 1976.
144. *Randall R.E.J., Rossmeisl E.C., Bleifer K.H.* Magnesium depletion in man. Ann. Intern. Med. 50(2): 257–287. 1959.
145. *Govil M.K., Mangal B.D., Alam S.M., Mahendru R.K., Srivastava D.K., Mudgal J.C.* Serum and cerebrospinal fluid calcium and magnesium levels in cases of idiopathic grand mal epilepsy and induced convulsions. J. Assoc. Physic. India. 29(9): 695–699. 1981.
146. *Sinert R., Zehtabchi S., Desai S., Peacock P., Altura B.T., Altura B.M.* Serum ionized magnesium and calcium levels in adult patients with seizures. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 67(3): 317–326. 2007.
147. *Mikati M.A., Injibar H., Kurdi R.M., El H.J., Abou R.S., Lteif L., Abdul J.M., Francis E., Geha G., Farhat F.* Effects of magnesium sulfate in kainic acid-induced status epilepticus. J. Med. Liban. 54(4): 200–204. 2006.
148. *Ghasemi A., Saberi M., Ghasemi M., Shafaroodi H., Moezi L., Bahremand A., Montaser-Kouhsari L., Ziai P., Dehpour A.R.* Administration of lithium and magnesium chloride inhibited tolerance to the anticonvulsant effect of morphine on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. Epilepsy Behav. 19(4): 568–574. 2010.
149. *Bac P., Herrenknecht C., Binet P., Durlach J.* Audiogenic seizures in magnesium-deficient mice: effects of magnesium pyrrolidone-2-carboxylate, magnesium acetyltaurinate. magnesium chloride and vitamin B-6. Magnes. Res. 6(1): 11–19. 1993.
150. *Safar M.M., Abdallah D.M., Arafa N.M., Abdel-Aziz M.T.* Magnesium supplementation enhances the anticonvulsant potential of valproate in pentylenetetrazol-treated rats. Brain Res. 1334: 58–64. 2010.
151. *Cotton D.B., Hallak M., Janusz C., Irtenkauf S.M., Berman R.F.* Central anticonvulsant effects of magnesium sulfate on N-methyl-D-aspartate-induced seizures. Am. J. Obstet. Gynecol. 168(3): 974–978. 1993.
152. *Bennet L., Galinsky R., Draghi V., Lear C.A., Davidson J.O., Unsworth C.P., Gunn A.J.* Time and sex dependent effects of magnesium sulphate on post-asphyxial seizures in preterm fetal sheep. J. Physiol. 596(23): 6079–6092. 2018.
153. *Lipton S.A.* Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. NeuroRx. 1(1): 101–110. 2004.
154. *Bialer M., Johannessen S.I., Kupferberg H.J., Levy R.H., Loiseau P., Perucca E.* Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference (EILAT IV). Epilepsy Res. 34(1): 1–41. 1999.
155. *Sun L., Lin S.S.* The anticonvulsant SGB-017 (ADCI) blocks voltage-gated sodium channels in rat and human neurons: comparison with carbamazepine. Epilepsia. 41(3): 263–270. 2000.
156. *Rogawski M.A., Yamaguchi S., Jones S.M., Rice K.C., Thurkauf A., Monn J.A.* Anticonvulsant activity of the low-affinity uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist (+-)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5H-dibenzoad-cyclohepten-5,10-imine (ADCI): comparison with the structural analogs dizocilpine (MK-801) and carbamazepine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 259(1): 30–37. 1991.
157. *Seidleck B.K., Thurkauf A., Witkin J.M.* Evaluation of ADCI against convulsant and locomotor stimulant effects of cocaine: comparison with the structural analogs dizocilpine and carbamazepine. Pharmacol. Biochem. Behav. 47(4): 839–844. 1994.
158. *Geter-Douglass B., Witkin J.M.* Behavioral effects and anticonvulsant efficacies of low-affinity, uncompetitive NMDA antagonists in mice. Psychopharmacology. 146(3): 280–289. 1999.

159. *Coleman M.H., Yamaguchi S., Rogawski M.A.* Protection against dendrotoxin-induced clonic seizures in mice by anticonvulsant drugs. Brain Res. 575(1): 138–142. 1992.
160. *Grant K.A., Snell L.D., Rogawski M.A., Thurkauf A., Tabakoff B.* Comparison of the effects of the uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist (+-)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5H-dibenzoad-cyclohepten-5,10-imine (ADCI) with its structural analogs dizocilpine (MK-801) and carbamazepine on ethanol withdrawal seizures. J. Pharmacol. Exp. Ther. 260(3): 1017–1022. 1992.
161. *Ghasemi M., Shafaroodi H., Nazarbeiki S., Meskar H., Ghasemi A., Bahremand A., Ziai P., Dehpour A.R.* Inhibition of NMDA receptor/NO signaling blocked tolerance to the anticonvulsant effect of morphine on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. Epilepsy Res. 91(1): 39–48. 2010.
162. *Taberner P.V.* The anticonvulsant activity of ketamine against seizures induced by pentylenetetrazol and mercaptopropionic acid. Eur. J. Pharmacol. 39(2): 305–311. 1976.
163. *Velísková J., Velísek L., Mares P., Rokyta R.* Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. Pharmacol. Biochem. Behav. 37(4): 667–674. 1990.
164. *D'Hooge R., Pei Y.Q., de Deyn P.P.* N-methyl-D-aspartate receptors contribute to guanidinosuccinate-induced convulsions in mice. Neurosci. Lett. 157(2): 123–126. 1993.
165. *Stafstrom C.E., Sasaki-Adams D.M.* NMDA-induced seizures in developing rats cause long-term learning impairment and increased seizure susceptibility. Epilepsy Res. 53(1–2): 129–137. 2003.
166. *Trommer B.L., Pasternak J.F.* NMDA receptor antagonists inhibit kindling epileptogenesis and seizure expression in developing rats. Brain Res. Dev. 53(2): 248–252. 1990.
167. *Borowicz K.K., Łuszczki J., Czuczwar S.J.* Interactions between non-barbiturate injectable anesthetics and conventional antiepileptic drugs in the maximal electroshock test in mice – an isobolographic analysis. Eur. Neuropsychopharmacol. 14(2): 163–172. 2004.
168. *Martin B.S., Kapur J.* A combination of ketamine and diazepam synergistically controls refractory status epilepticus induced by cholinergic stimulation. Epilepsia. 49(2): 248–255. 2008.
169. *Kim K.K., Zaitsev A.V., Lavrent'eva V.V., Zhabko E.P., Vataev S.I., Lukomskaya N.Y., Magazanik L.G.* Effects of Ionotropic Glutamate Receptor Blockers on Pentylenetetrazole-Induced Seizures in Krushinskii–Molodkina Rats. Neurosci. Behav. Physiol. 44(8): 945–950. 2014.
170. *Chen B., Feng B., Tang Y., You Y., Wang Y., Hou W., Hu W., Chen Z.* Blocking GluN2B subunits reverses the enhanced seizure susceptibility after prolonged febrile seizures with a wide therapeutic time-window. Exp. Neurol. 283: 29–38. 2016.
171. *Jansen M., Dannhardt G.* Antagonists and agonists at the glycine site of the NMDA receptor for therapeutic interventions. Eur. J. Med. Chem. 38(7–8): 661–670. 2003.
172. *Chen H.-S.V., Lipton S.A.* The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. J. Neurochem. 97(6): 1611–1626. 2006.
173. *Kalia L.V., Kalia S.K., Salter M.W.* NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. Lancet Neurol. 7(8): 742–755. 2008.
174. *Berger P., Farrel K., Sharp F., Skolnick P.* Drugs acting at the strychnine-insensitive glycine receptor do not induce HSP-70 protein in the cingulate cortex. Neurosci. Lett. 168(1–2): 147–150. 1994.
175. *Niquet J., Lumley L., Baldwin R., Rossetti F., Suchomelova L., Naylor D., Estrada I.B.F., Schultz M., Furtado M. de A., Wasterlain C.G.* Rational polytherapy in the treatment of cholinergic seizures. Neurobiol. Dis. 133: 104537. 2020.
176. *Schidlitzki A., Twele F., Klee R., Waltl I., Römermann K., Bröer S., Meller S., Gerhauser I., Rankovic V., Li D., Brandt C., Bankstahl M., Töllner K., Löscher W.* A combination of NMDA and AMPA receptor antagonists retards granule cell dispersion and epileptogenesis in a model of acquired epilepsy. Sci. Rep. 7(1): 1–19. 2017.
177. *Brandt C., Potschka H., Loscher W., Ebert U.* N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience. 118(3): 727–740. 2003.
178. *Santamaría A., Ríos C.* MK-801, an N-methyl-d-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. Neurosci. Lett. 159(1): 51–54. 1993.
179. *Yang Q., Huang Z., Luo Y., Zheng F., Hu Y., Liu H., Zhu S., He M., Xu D., Li Y., Yang M., Yang Y., Wei X., Gao X., Wang W., Ma J., Ma Y., Wang X., Wang Q.* Inhibition of Nwd1 activity attenuates neuronal hyperexcitability and GluN2B phosphorylation in the hippocampus. EBioMedicine. 47: 470–483. 2019.
180. *Rodríguez-Muñoz M., Onetti Y., Cortés-Montero E., Garzón J., Sánchez-Blázquez P.* Cannabidiol enhances morphine antinociception, diminishes NMDA-mediated seizures and reduces stroke damage via the sigma 1 receptor. Mol. Brain. 11(1): 1–12. 2018.
181. *Yang Y., Tian X., Xu D., Zheng F., Lu X., Zhang Y., Ma Y., Li Y., Xu X., Zhu B., Wang X.* GPR40 modulates epileptic seizure and NMDA receptor function. Sci. Adv. 4(1): 1–12. 2018.

182. *Koek W., Colpaert F.C.* Selective blockade of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced convulsions by NMDA antagonists and putative glycine antagonists: relationship with phencyclidine-like behavioral effects. J. Pharmacol. Exp. Ther. 252(1): 349–357. 1990.
183. *Chiamulera C., Costa S., Reggiani A.* Effect of NMDA- and strychnine-insensitive glycine site antagonists on NMDA-mediated convulsions and learning. Psychopharmacology (Berl). 102(4): 551–552. 1990.

Role of NMDA Receptors in Epileptogenesis

J. L. Ergina[a], A. A. Kovalenko[a], and A. V. Zaitsev[a, *]

[a]*Sechenov Institute of Evolutionary Biochemistry and Physiology, St. Peterburg, Russia*
**e-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru*

Epilepsy is characterized by the occurrence of recurrent, spontaneous seizures. Pharmacoresistance is observed in almost 30% of cases, in which instance, the disease can worsen and lead to cognitive impairments and the development of comorbid neuropsychiatric disorders. Early therapeutic intervention can reduce the severity of the disease. At the same time, suppression of epileptogenesis is considered the most promising strategy for preventing epilepsy development after epileptogenic traumatic events. NMDA receptors are regarded as one of the most promising targets for suppressing epileptogenesis. NMDA receptor functions were shown to be impaired at all stages of epilepsy development. Changes in their expression are observed as early as the first hours after acute seizures, and NMDA receptors are actively involved in the generation of epileptic activity. Moreover, antagonists of NMDA receptors efficiently suppress epileptiform activity in various seizures models and models of status epilepticus. In this review, we consider the available data on the role of NMDA receptors in the development of epilepsy, changes in their expression at different periods of epileptogenesis, and the potential of antagonists and modulators of NMDA receptors in the prevention of epileptogenesis.

Keywords: NMDA receptor, NMDA receptor antagonist, NMDA receptor subunit, epileptogenesis, epilepsy model

ЦИТИРОВАТЬ:

Ергина Ю.Л., Коваленко А.А., Зайцев А.В. Роль NMDA-рецепторов в эпилептогенезе. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1455–1478.

DOI: 10.31857/S0869813920120031

TO CITE THIS ARTICLE:

Ergina J.L., Kovalenko A.A., Zaitsev A.V. Role of NMDA Receptors in Epileptogenesis. Russian Journal of Physiology. 106(12): 1455–1478.

DOI: 10.31857/S0869813920120031

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1479–1495

ОБЗОРЫ

РОЛЬ АПОПТОЗА ПРИ ИНФЕКЦИЯХ

© 2020 г. И. С. Фрейдлин[1, 2, *], Д. Т. Маммедова[1], Э. А. Старикова[1, 2]

[1]*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*
[2]*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*
**E-mail: irinaf-n@yandex.ru*

Поступила в редакцию 15.07.2020 г.
После доработки 05.10.2020 г.
Принята к публикации 20.10.2020 г.

Апоптоз является нормальным физиологическим процессом, направленным на регуляцию размеров клеточных популяций за счет поддержания баланса между пролиферацией и гибелью клеток. При бактериальных и вирусных инфекциях апоптоз может рассматриваться как способ защиты организма хозяина, направленный на элиминацию инфицированных клеток без индукции воспалительной реакции. Апоптоз участвует в разрешении воспаления за счет ряда механизмов, ингибирующих иммунный ответ. В качестве одного из факторов антимикробного иммунитета апоптоз может способствовать очищению организма от возбудителей и в то же время обеспечивает кросс-презентацию микробных антигенов для индукции адаптивного иммунного ответа в условиях инфекции. Патогенные микроорганизмы при выживании и размножении в организме хозяина используют разнообразные стратегии, позволяющие регулировать процессы апоптоза. Бактерии и вирусы способствуют элиминации защитных иммунных клеток, индуцируя их апоптоз. В то же время подавление процессов апоптоза в инфицированных клетках позволяет патогенам сохранять необходимые для своего выживания репликативные ниши и избегать атаки со стороны клеток иммунной системы организма-хозяина. Разработка препаратов для целенаправленной искусственной регуляции процессов апоптоза открывает новые возможности для терапии инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: апоптоз, инфекция, иммунный ответ

DOI: 10.31857/S0869813920120043

Апоптоз является нормальным физиологическим процессом, направленным на регуляцию размеров клеточных популяций за счет поддержания баланса между выживанием и гибелью клеток. При инфекции апоптоз может рассматриваться как один из защитных механизмов, способствующих элиминации инфицированных клеток без индукции воспалительной реакции, которая сопутствует некротической гибели. Это особенно важно в барьерных тканях, таких как кишечный эпителий. В этом случае некротическая гибель зараженных клеток с развитием воспалительного процесса может приводить к нарушению барьерной функции эпителия и усиливать вероятность инвазии микробов, в том числе, симбиотических. Индукция апоптоза при инфекциях способствует эффективной элиминации репликативных ниш и ограничению возможности диссеминации внутриклеточно паразитирующих патогенов, благодаря последующему фагоцитозу апоптотических тел инфицированных клеток. Апоптоз также играет важную роль в презентации микробных

антигенов Т-лимфоцитам для индукции адаптивного иммунитета. Индукция апоптоза при завершении инфекции служит важным механизмом элиминации эффекторных популяций лимфоцитов для терминации иммунного ответа и восстановления гомеостаза [1, 2].

Патогенные микроорганизмы используют разнообразные стратегии, позволяющие регулировать процессы апоптоза, чтобы инвазировать, выжить и размножаться в организме хозяина. За счет индукции апоптоза бактерии и вирусы способствуют элиминации иммунных клеток, участвующих в поддержании протективного иммунного ответа. И наоборот, ингибируя процессы апоптоза, патогены сохраняют необходимые для их выживания репликативные ниши и избегают атаки со стороны клеток иммунной системы организма-хозяина. Один и тот же патоген на разных стадиях развития инфекции может разнонаправленно регулировать этот процесс [3].

ПУТИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА

Морфологически апоптоз проявляется сморщиванием клетки, конденсацией ядра, образованием пузырей в цитоплазме. Более точными маркерами этого процесса является активация каскада каспаз (цистеин-зависимых аспартат-специфических протеаз), деполяризация мембран митохондрий, олигонуклеосомальная фрагментация ДНК, усиление продукции активных форм кислорода (АФК), перераспределение в клетке цитохрома С, активация проапоптотического белка Bax, транслокация фосфатидилсерина (PtdSer) с внутренней поверхности плазматической мембраны клетки на наружную.

В настоящее время выделяют экзогенный и эндогенный пути индукции апоптоза. Экзогенный путь индукции апоптоза запускается после связывания специфических трансмембранных белков TNF-R1, Fas (APO-1 или CD95), DR4 (TRAIL-RI) и DR5 (TRAIL-RII) на поверхности клетки-мишени с их лигандами: TNFα, FasL (от англ. Fas ligand) и TRAIL (от англ. TNF-related apoptosis-inducing ligand) соответственно. Связывание рецепторов апоптоза с лигандами инициирует формирование мультибелкового комплекса DISC (Death-inducing signaling complex), образованного членами семейства “рецепторов смерти”, адапторной молекулой FADD (от англ. Fas-associated protein with death domain) и каспазой 8. FADD служит платформой для рекрутирования и активации инициирующих каспаз 8, 10 и далее – эффекторных каспаз 3, 6, 7 [4, 5]. Этот сигнальный каскад завершается апоптотической гибелью клеток, что сопровождается экспозицией на наружной поверхности цитоплазматической мембраны PtdSer [6].

Эндогенный или митохондриальный путь индукции апоптоза контролируется белками, относящимися к семейству Bcl-2, регулирующими пермеабилизацию внешней мембраны митохондрий (MOMP – от англ. Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). В рамках этого семейства выделяют BH3-only-семейство проапоптотических и Bcl-2-семейство антиапоптотических белков, которые экспрессируются на наружной поверхности мембран митохондрий. Активность проапоптотических молекул в норме подавляется антиапоптотическими [3]. В ответ на сигналы апоптоза (например, инфицирование) в клетках активируются Bax/Bak (BH3-only-семейство белков), что вызывает MOMP и выход в цитозоль митохондриальных белков смерти, в том числе, цитохрома С [6, 7]. Экзогенный и эндогенный пути индукции апоптоза ведут к активации каспазы 3, конденсации хроматина и другим морфологическим изменениям, связанным с завершением апоптоза и образованием апоптотических телец [8].

РЕЦЕПТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА

Сигнальные пути индукции апоптоза совпадают или пересекаются с сигнальными путями, регулирующими развитие воспаления и иммунного ответа. Это объясняет взаимосвязь между активацией клеток в ходе воспаления и усилением их чувствительности к сигналам, запускающим апоптоз [9]. Паттерн-распознающие рецепторы (PRRs – от англ. Pattern Recognition Receptors) являются сенсорами консервативных микробных компонентов (PAMPs – от англ. Pathogen-Associated Molecular Patterns) и участвуют в индукции реакций врожденного и адаптивного иммунитета при инфекции. Распознавание микробных паттернов приводит к активации NF-κB-, MAPK- и IRFI-сигнальных внутриклеточных каскадов, способных запускать процессы апоптоза [1, 10, 11]. Активация NF-κB-сигнального пути после связывания PRRs с лигандами может индуцировать синтез белков, индуцирующих (Fas, c-myc, p53, TNF, DR, и каспаза 11) или ингибирующих (IAP белки, Bcl-2-подобные белки) апоптоз. NF-κB-опосредованное ингибирование апоптоза сопровождается повышением продукции провоспалительных цитокинов и усилением воспаления [6]. Большинство исследований процессов апоптоза посвящено роли Fas (CD95/APO-1) и TRAIL (CD253, TNFSF10, APO2) семейства TNF-рецепторов в регуляции этого типа клеточной гибели. Сигнальный путь Fas задействован в опосредованном $CD8^+$ Т-лимфоцитами уничтожении зараженных вирусом клеток, элиминации аутореактивных клонов лимфоцитов в центральных органах иммунной системы и эффекторных популяций лимфоцитов по окончании иммунного ответа [6]. TRAIL-сигнальный путь, так же как Fas вовлечен в регуляцию развития иммунного ответа [12].

АПОПТОЗ КАК МЕХАНИЗМ ЗАЩИТЫ ОТ ПАТОГЕНОВ

Распространенным следствием инвазии патогенов в клетки организма-хозяина является их гибель путем апоптоза, но гибель зараженных клеток сам по себе не способствует элиминации патогена. Напротив, если инфицированные мертвые клетки быстро не поглощаются фагоцитами, это может приводить к высвобождению и дальнейшей диссеминации патогенов. Поэтому принципиальную роль в ограничении диссеминации патогена играет фагоцитоз апоптотических тел зараженных клеток, который получил название эфероцитоз. Было установлено, что этот процесс важен для элиминации *Mycobacterium tuberculosis* [13, 14]. При заражении макрофагов низковирулентными штаммами микобактерий в инфицированных клетках запускается апоптоз. Последующий эфероцитоз апоптотических тел соседними макрофагами обеспечивает элиминацию патогена. В отличие от этого, высокопатогенные штаммы *M. tuberculosis*, инфицируя макрофаги, направленно ингибируют апоптоз зараженных клеток и, подавляя формирование фаголизосомы, сохраняют репликативные ниши [15].

В физиологических условиях фагоцитоз апоптотических тел является важным механизмом поддержания иммунологической толерантности к собственным антигенам. Однако фагоцитоз апоптотических тел инфицированных клеток способствует индукции адаптивного иммунного ответа против патогенов. На поверхности большинства клеток организма в составе молекул MHC I класса презентируются исключительно пептиды эндогенного происхождения. Эфероцитоз служит одним из основных механизмов, обеспечивающих презентацию в составе молекул MHC I класса экзогенных антигенов (кросс-презентацию) с активацией антиген-специфических клонов цитотоксических Т-лимфоцитов [16–18]. Тонкие механизмы, регулирующие эти процессы, остаются малоизученными. Установлено, что апоптотические клетки продуцируют специфические привлекающие фагоциты хемоат-

тракты: хемокины (CX3CL1) [19], липиды (сфингозин-1-фосфат (s1P) [20], лизофосфатидилфолин (LPC) [21] и нуклеотиды (atP, utP) [22, 23]. Кроме того, такие клетки экспонируют на своей поверхности молекулы типа “eat me”, из которых PtdSer является единственным универсальным маркером апоптоза. Поверхностные белки фагоцитирующих клеток, которые могут прямо или опосредованно связываться с этим фосфолипидом, являются наиболее хорошо изученными. Сигналы “eat me” могут распознаваться фагоцитарными рецепторами (TIM, CR3, CR4, SRA, CD36, CD206, α5β3- и α5β5- интегринами) непосредственно или через адапторные молекулы (коллектины, C1q-компонент комплемента, маннозосвязывающий лектин, пентраксин 3 и фиколины) [18, 24–27].

Нередко проникновение патогенов в макрофаги может происходить в результате рецептор-опосредованного фагоцитоза апоптотических тел инфицированных клеток. Мембранный белок макрофагов TIM4 (от англ. T-cell immunoglobulinand mucin-domain-containing molecule) способен связывать экспонируемый на мембране апоптотичеких клеткок PtdSer и служит рецептором эфферoцитоза [8].

После захвата дендритными клетками апоптотические тела, содержащие микробные антигены, попадают в эндосомы, в кислой среде которых под действием катепсина D происходит их протеолиз. Для того, чтобы экзогенные белки, содержащиеся в эндосомах, транспортировались в цитозоль, они должны быть развернуты, и этот процесс анфолдинга осуществляется специальным ферментом GILT (от англ. gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase). Далее пептиды транспортируются в цитозоль и в протеосомы для деградации [28–33]. Продукты протеосомной деградации поступают в эндоплазматический ретикулум, и образующиеся комплексы антигенов с молекулами MHC I транспортируются на поверхность дендритных клеток для презентации и распознавания цитотоксическими $CD8^+$ Т-клетками. Дендритные клетки также могут презентировать пептиды из фагосом, содержащих апоптотический материал, в ассоциации с молекулами MHC II класса. Это обеспечивает распознавание антигенов $CD4^+$ Т-клетками, что также необходимо для индукции адаптивного иммунного ответа на внутриклеточные патогены [23, 34, 35].

В литературе существуют многочисленные данные, подтверждающие, что эфферoцитоз при инфекции является важным источником антигенов для перекрестной презентации дендритными клетками [23, 36–41]. Кросс-презентация играет ключевую роль в инициации адаптивного иммунного ответа на вирусы. Поскольку для праймирования $CD8^+$ Т-клеток требуется доступ вирусных антигенов к аппарату процессинга и презентации в составе MHC I класса, индукция адаптивного иммунного ответа против вирусов, неспособных продуктивно инфицировать дендритные клетки, зависит от эфферoцитоза зараженных апоптотических клеток и последующей кросс-презентации антигенов. Было установлено, что эфферoцитоз апоптотических тел моноцитов, инфицированных вирусом гриппа, обеспечивает презентацию антигенов вируса в составе MHC I класса и активацию $CD8^+$ Т-лимфоцитов [23, 34, 35]. Такие же результаты были получены в исследованиях апоптотических тел клеток, зараженных *Salmonella typhimurium*, CMV человека (Human cytomegalovirus), *M. tuberculosis*, HSV (Herpes simplex virus) и HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) [23, 36–41]. Поглощение дендритными клетками апоптотических тел HIV-1-инфицированных клеток приводило к кросс-презентации антигенов в составе MHC класса I и одновременно обеспечивало презентацию вирусных антигенов в составе молекул MHC II класса $CD4^+$ Т-лимфоцитам [23, 38]. Роль эфферoцитоза в перекрестной презентации вирусных антигенов была доказана при инфекциях, вызванных вирусами оспы, кори, HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus-1) и EBV (Epstein-Barr virus) [29, 41]. Аналогичные наблюдения были сделаны для ря-

да внутриклеточно паразитирующих бактерий, включая *Listeria monocytogenes* и *M. tuberculosis* [18, 29]. Поглощение апоптотических тел макрофагов инфицированных *M. tuberculosis* и BCG-дендритными клетками приводило к активации $CD8^+$ Т-лимфоцитов [40, 42]. Зараженные *Salmonella typhimurium* макрофаги погибали путем апоптоза. Апоптотические тела фагоцитировались ближайшими дендритными клетками, которые презентировали бактериальные антигены Т-лимфоцитам [41]. Зависимость эффективности кросс-презентации бактериальных антигенов от экспрессии на фагоцитах специфических рецепторов для захвата апоптотического материала была доказана с использованием дендритных клеток селезенки мышей, которые активно фагоцитировали апоптотические тела клеток RAW264.7, содержащих *Escherichia coli*, и презентировали их антигены в комплексе с MHC I класса [43].

На исход эфероцитоза зараженной умирающей клетки влияет как сам возбудитель инфекции, так и микроокружение. Фагоциты могут интегрировать эти сигналы, чтобы вызвать наиболее подходящий тип иммунного ответа. Присутствие патогенов в апоптотических клетках индуцирует активацию фагоцитов за счет взаимодействия PAMPs с PRRs [18, 44]. Показано, что комбинация апоптотических сигналов и сигналов от TLR-4 индуцирует продукцию дендритными клетками TGF-β, IL-23 и IL-6, это способствует дифференцировке Th17 эффекторных лимфоцитов [18, 45]. Эфероцитоз апоптотических тел инфицированных *E. coli* клеток макрофагальной линии индуцирует экспрессию дендритными клетками CD86, CCR7 и продукцию IL-6, TGF-β и IL-23. При этом эфероцитоз апоптотических тел неинфицированных клеток не оказывает подобного влияния на дендритные клетки [18, 46].

Аппарат эндогенного пути индукции апоптоза может играть самостоятельную роль в иммунной защите. Было показано, что инфицирование клеток рядом внутриклеточно паразитирующих бактерий и вирусов вызывает минимальную MOMP с ограниченной (сублетальной) активацией каспаз, недостаточной для индукции клеточной гибели [47]. Способность клеток выживать в этом случае обеспечивается сохранением в клетке некоторого количества интактных митохондрий с нормальным MOMP [48]. Резистентность митохондрий к MOMP зависит от активации белков Bax или Bak из семейства Bcl-2. Незавершенный апоптоз сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов и, по мнению авторов, носит защитный характер. В случае направленного ингибирования эндогенного пути индукции апоптоза при микробной инфекции, секреция провоспалительных цитокинов существенно снижалась, и способность эпителиальных клеток ограничивать внутриклеточный рост бактерий была нарушена [49].

Одна из важнейших функций апоптоза при инфекции состоит в поддержании оптимального количества циркулирующих лейкоцитов, которые при воспалении в большом количестве выходят в периферическую кровь и рекрутируются в очаг воспаления и инфекции. От активности апоптоза зависит своевременность удаления нежизнеспособных клеток, накапливающихся в организме под влиянием разных повреждающих воздействий, в том числе инфекции. При этом провоспалительная регуляторная роль апоптоза изменяется на противовоспалительную [1]. Противовоспалительные сигналы обеспечивают распознавание фагоцитами PtdSer на поверхности апоптотических клеток, что индуцирует продукцию регуляторных цитокинов, таких как TGF-β и IL-10 [50, 51] и позволяет избежать развития воспалительных и потенциальных аутоиммунных реакций [18, 52, 53].

МОДУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА КАК СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ ПАТОГЕНА В ОРГАНИЗМЕ ХОЗЯИНА

Апоптогенность и антиапоптогенность штаммов возбудителей инфекций контролируется генетически и по-разному соотносится с их вирулентностью. Как пра-

вило, действие патогенов направлено на искажение физиологических механизмов регуляции апоптотической программы. Вместе с тем, многие микроорганизмы за счет дисрегуляции апоптоза обеспечивают себе более “комфортные” условия выживания в организме хозяина. Другой вариант стратегии выживания патогенов в организме хозяина связан с индукцией апоптоза клеток иммунной системы организма, функции которых направлены на элиминацию возбудителей инфекции.

Самой очевидной стратегией патогенов, связанной с регуляцией апоптоза, является индукция гибели эффекторных популяций лейкоцитов для избегания атаки со стороны иммунной системы организма-хозяина. Например, при инфекции, вызванной *Streptococcus pyogenes*, первоначальное усиление провоспалительных функций гранулоцитов (хемотаксиса, фагоцитоза, дегрануляции и продукции АФК) при запуске апоптоза сменялось их угнетением [54]. В экспериментах на мышах была выявлена зависимость характера клеточной гибели и воспалительного ответа гранулоцитов от вирулентности штаммов *Streptococcus pyogenes*. Авирулентный штамм *Streptococcus pyogenes* при заражении нейтрофилов вызывал активацию каспазы 3 и фрагментацию ядер клеток. В отличие от этого, вирулентный штамм стрептококка индуцировал вакуолизацию клеток с повышением проницаемости плазматической мембраны, что вело к некротической гибели клеток с развитием воспаления [55].

Индукция апоптоза лимфоцитов может использоваться патогенными бактериями для ослабления реакций адаптивного иммунитета. Ранняя лимфопения, описанная при инфекции, вызванной *L. monocytogenes*, являлась результатом апоптоза лимфоцитов, индуцированного фактором патогенности этих бактерий – листериолизином. Гибель лимфоцитов вела к снижению эффективности клеточных защитных реакций [56].

Но не всегда гибель клеток организма-хозяина бывает полезна патогенным бактериям. Внутриклеточно паразитирующие бактерии нуждаются в сохранении инфицированных клеток в качестве ниш для собственного выживания и размножения. В этом случае бактерии могут ингибировать или модифицировать процесс апоптоза. *L. pneumophila* формируют в макрофагах вакуоль для репликации, в которой синтезируют бактериальные белки, ингибирующие проапоптотические сигналы в инфицированных клетках и, таким образом, способствуют усилению их жизнеспособности [57].

Ингибирование апоптоза в клетках, зараженных *M. tuberculosis*, может снижать эффективность эфероцитоза и кросс-презентации антигенов. Это подтверждают данные экспериментов, в которых было показано, что *M. tuberculosis*, ингибируя апоптоз, способствуют развитию некроза инфицированных макрофагов, и это ограничивает активацию специфических $CD8^+$ Т-лимфоцитов [18, 58–60].

Установлено, что среди облигатно внутриклеточных паразитов преобладают ингибирующие апоптоз эффекты, а среди внеклеточно паразитирующих преобладают эффекты, активирующие этот процесс. Однако четкой взаимосвязи антиапоптотической активности с внутриклеточным паразитированием бактерий не прослеживается. Патогены могут использовать отсроченную клеточную гибель в начале инфекции и индукцию клеточной гибели на поздних стадиях для выхода бактерий из зараженных клеток. Внеклеточно паразитирующие бактерии, такие как *S. pyogenes*, нередко приобретают свойства факультативно внутриклеточно паразитирующих бактерий и вместе с этим способность ингибировать апоптоз [61].

Одни и те же патогены в динамике инфекции могут прибегать к разным стратегиям: индуцировать или ингибировать апоптоз, использовать разные механизмы влияния на апоптоз в зависимости от того, какие клетки организма они заражают [3]. *Salmonella* spp. могут подавлять апоптоз в эпителиальных клетках кишечника, обес-

печивая свое длительное внутриклеточное выживание, но индуцировать апоптоз макрофагов в Пейеровых бляшках для усиления диссеминации [62].

Трудно однозначно оценить зависимость характера влияния на апоптоз от степени вирулентности патогена. У одних бактерий (например, *S. pyogenes)* доказана прямая корреляция между вирулентностью и способностью индуцировать апоптоз [61]. У других бактерий (например, *M. tuberculosis*), напротив, низкая вирулентность аттенуированных штаммов сопряжена с активной индукцией апоптоза [63]. Ингибирование апоптоза в инфицированных вирулентными *M. tuberculosis* макрофагах служит для создания репликативных ниш и позволяет патогену избежать атаки со стороны клеток иммунной системы. Авирулентные и аттенуированные бактерии индуцировали значительно более выраженный апоптоз по сравнению с вирулентными, хотя вирулентные штаммы реплицировались в макрофагах гораздо быстрее, чем аттенуированные. Очевидно, апоптоз макрофагов в этом случае служил защитной реакцией, препятствующей внутриклеточной репликации бактерий [64].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Патогенные бактерии могут влиять на апоптоз опосредованно, вмешиваясь во внутриклеточные сигнальные пути (например, NF-κB) и непосредственно воздействовать на отдельные звенья апоптотического каскада (мембрану митохондрий и каспазы) (рис. 1, табл. 1). В частности, влияние патогенов на процессы апоптоза опосредовано связыванием PAMPs и других бактериальных факторов с рецепторами PRRs, FasL, TNF-R1, Apo2/Apo3 на клетках организма-хозяина. Например, *Yersinia* sp. для индукции апоптоза в инфицированных мышиных макрофагах используют сигнальный путь от рецептора TLR4 с активацией адаптерного белка TRIF [65].

Примером сложного взаимодействия патогена с клетками организма-хозяина служит апоптоз макрофагов при иерсиниозе. В ответ на заражение, в макрофагах происходит активация MAPK- и NF-κB-сигнальных путей. Это поддерживает жизнеспособность клеток за счет усиления экспрессии ингибиторов апоптоза. Для противодействия этому *Yersinia* spp. секретируют протеазу YopJ, которая инактивирует MAPK- и NF-κB-сигнальные каскады и индуцирует апоптоз макрофагов [66].

Часто действие бактериальных факторов патогенности опосредовано их влиянием на экспрессию регулирующих апоптоз Bcl-белков [1]. Так, апоптоз, индуцированный токсином PorB, который продуцирует *Neisseria gonorrhoeae*, связан с формированием пор и нарушением проницаемости мембраны митохондрий, одновременно тот же токсин активирует проапоптотический белок BH3 [67]. Цитотоксин VacA, который продуцирует *Helicobacter pylori*, индуцирует апоптоз за счет активации проапоптотического белка Bax [68]. Тот же VacA вызывает снижение экспрессии STAT3 и ответственных за выживание клетки белков семейства Bcl-2: Bcl-XL, Bcl-2, что ведет к апоптозу эпителиальных клеток желудка [69].

Использование апоптоза для элиминации клеток иммунной системы организма-хозяина характерно для *S. pyogenes*. Инфекция, вызванная стрептококками группы A (GAS), индуцирует апоптотическую гибель макрофагов за счет активации матриксных металлопротеаз стрептококковой цистеиновой протеазой SpeB. Негативные по SpeB GAS мутанты не обладают выраженной способностью к индукции апоптоза в отличие от дикого типа GAS [61]. На мышиной модели тяжелой инвазивной GAS-инфекции было показано, что SpeB индуцирует продукцию в макрофагах проапоптотических TNFα и FasL. С помощью методов ДНК-микрочипов и RT-PCR было установлено, что при GAS инфекции в мышиных макрофагах происходила активация генов, кодирующих каспазы1, 9, 14. Индукция апоптоза при

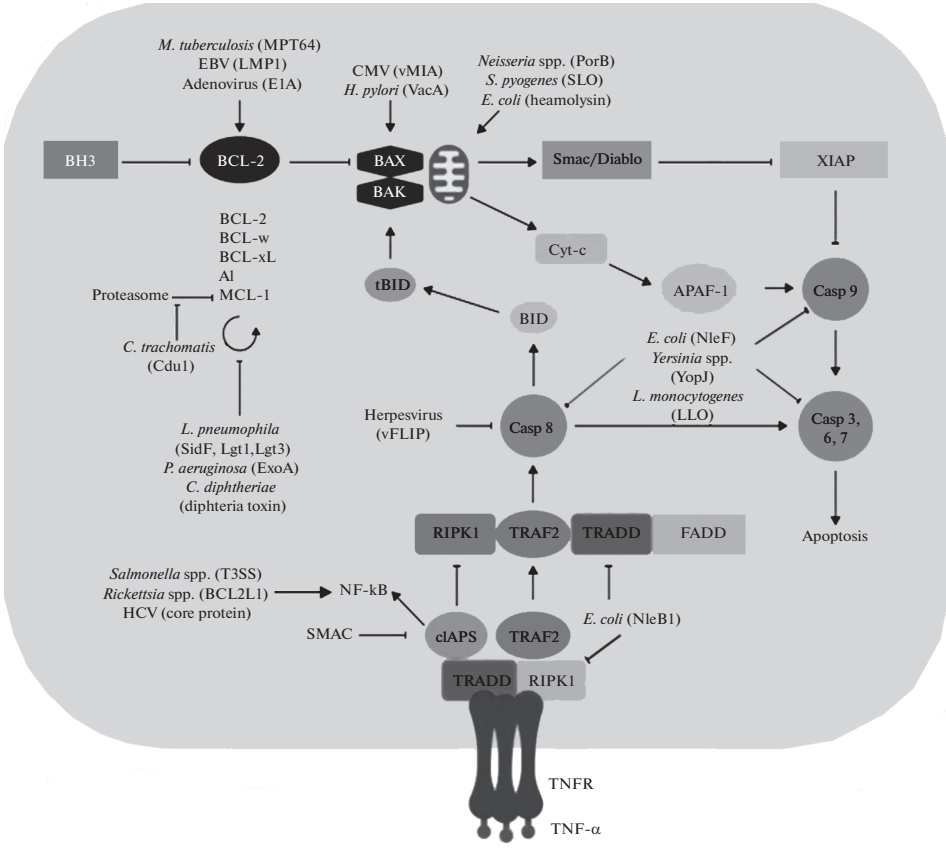


Рис. 1. Влияние бактерий и вирусов на пути апоптоза (по [3]). Бактерии и вирусы индуцируют митохондриальный (эндогенный) или опосредованный рецепторами клеточной гибели (экзогенный) пути апоптоза. Патогены (и их продукты) либо прямо интерферируют с апоптозом путем активации BCL-2-белков, влияния на митохондрии, каспазы либо нарушают сигналинг от рецепторов клеточной гибели.
Fig. 1. Targeting apoptosis pathways by bacteria and viruses (by [3]). Pathogens induce the mitochondria (intrinsic) or cell death receptor (extrinsic) mediated apoptosis pathway. Pathogens (and their effectors) either directly interfere with apoptosis by triggering the upregulation of BCL-2 proteins, targeting mitochondria, caspases, or target death receptor signaling.

этом способствовала уменьшению популяции макрофагов и выживанию патогенных стрептококков [70]. Фактор вирулентности *S. pyogenes* стрептолизин O (SLO) индуцирует апоптоз макрофагов *in vitro* за счет ремоделирования и деполяризации мембран митохондрий, с выделением цитохрома C и активацией каспаз. В модели системной стрептококковой инфекции у мышей было показано, что дефицитные по SLO мутанты *S. pyogenes* отличались сниженной способностью индуцировать апоптоз и сниженной вирулентностью. Общий ингибитор каспаз блокировал SLO-индуцированный апоптоз и усиливал бактерицидность макрофагов в отношении стрептококка [71].

Разнообразные механизмы блокирования клеточной гибели являются важными компонентами стратегии выживания и размножения внутриклеточно паразитирующих бактерий: *M. tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp.

Таблица 1. Влияние бактерий на пути апоптоза (по [3, 12])
Table 1. Targeting apoptosis pathways by bacteria (by [3, 12])

Бактерии Bacteria	Апоптоз Apoptosis	Механизм действия Mechanism	Клетки-мишени Cell type
C. diphtheriae	Индукция Induction	Эукариотический фактор элонгации 2 Eukaryotic elongation factor 2	Эпителиальные клетки Epithelial cells
P. aeruginosa	Индукция Induction	Эукариотический фактор элонгации 2 Eukaryotic elongation factor 2	Эпителиальные клетки Epithelial cells
N. gonorrhoeae	Индукция Induction	Усиление MOMP Increases MOMP	Эпителиальные клетки Epithelial cells
	Ингибирование Inhibition	Экспрессия генов антиапоптотических белков Increases antiapoptotic genes	Полиморфоядерные лейкоциты PMLs
S. flexneri	Индукция Induction	Активация каспазы 1 Caspase 1 activation	Макрофаги Macrophages
	Ингибирование Inhibition	Подавление выхода цитохрома С Prevents cytochrome *c* release	Эпителиальные клетки Epithelial cells
L. pneumophila	Индукция Induction	Каспаза 3 Caspase 3	Макрофаги Macrophages, эпителиальные клетки Epithelial cells
	Ингибирование Inhibition	Экспрессия генов антиапоптотических белков Increases antiapoptotic genes	Моноциты Monocyte клетки U937, A549
E. coli K1	Индукция Induction	Экзогенный и эндогенный пути Extrinsic and intrinsic pathways	Эпителиальные клетки Epithelial cells
	Ингибирование Inhibition	Экспрессия BclXL Expression BclXL	Макрофаги Macrophages
R. rickettsii	Ингибирование Inhibition	Активация путей выживания в клетке Activation of cell survival pathways	Эндотелиальные клетки Endothelial cells
	Индукция Induction	Фрагментация ДНК DNA fragmentation	Нейроны Neurons
M. tuberculosis	Индукция Induction	Сигнальный каскад. TNF, эндогенный путь TNF pathway, Intrinsic pathway	Макрофаги Macrophages
	Ингибирование Inhibition	Активация NF-κB, экспрессия Bcl-2 Activation of the NF-κB, expression of Bcl-2	Эпителиальные клетки Epithelial cells
C. trachomatis	Ингибирование Inhibition	Блокирование выхода цитохрома С Blocking the release of cytochrome C	Эпителиальные клетки Epithelial cells
L. monocytogenes	Индукция Induction	Каспазы-3,-6,-9 Caspases-3,-6, -9	Макрофаги Macrophages
S. typhimurium	Индукция Induction	Caspase 1 activation	Макрофаги Macrophages
Y. pseudotuberculosis	Ингибирование Inhibition	Подавление продукции АФК Inhibition ROS production	Полимофоядерные лейкоциты PMLs
	Индукция Induction	Ингибирование ERK и NF-κB Inhibition ERK and NF-κB	Макрофаги, дендритные клетки Macrophages, dendritic cells

Жирным шрифтом выделены внутриклеточно паразитирующие бактерии.
Bold – intracellular parasitic bacteria.

(табл. 1). Мишенями их действия могут быть NF-κB- или инфламмасома-зависимые сигнальные каскады [72]. Для ингибирования апоптоза патогены также используют защиту митохондрий и предупреждение выхода цитохрома C (*Chylamidia* spp. и *Neisseria* spp.), активацию генов, ответственных за выживание клеток (*Salmonella* spp. и *Rickettsia* spp.), ингибирование каспаз, активацию фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и протеинкиназы B (PKB) (*Shigella* spp. и *Legionella* spp.) [3, 73].

Патогенные бактерии могут индуцировать в клетках синтез антиапоптотических белков. Такой механизм подавления апоптоза для создания репликативных ниш в зараженных клетках использует *M. tuberculosis* [3]. Для *M. tuberculosis* характерна обратная корреляция между вирулентностью и способностью индуцировать апоптоз. Индуцированный при заражении макрофагов микобактериями апоптоз способствует очищению организма от патогена [58, 59]. Макрофаги, инфицированные аттенуированными штаммами *M. tuberculosis*, усиленно продуцируют PGE2 (Prostaglandin E2), который препятствует некрозу и способствует развитию апоптоза. Вирулентные штаммы *M. tuberculosis* ингибируют продукцию PGE2, но индуцируют синтез липоксина A4 (LXA4), что увеличивает вероятность гибели клеток путем некроза. Способность вирулентных *M. tuberculosis* активно ингибировать апоптоз макрофагов была подтверждена в экспериментах на нокаутированных мышах, неспособных продуцировать PGE2. Макрофаги таких мышей погибали путем некроза при внутриклеточной инфекции *M. tuberculosis*. Таким образом, регуляция баланса продукции PGE2 и LXA4 зависит от вирулентности *M. tuberculosis* и определяет механизм гибели инфицированных макрофагов, что влияет на исход инфекции [60]. При изучении молекулярных механизмов регуляции этих процессов было установлено, что *M. tuberculosis* индуцирует эндогенный путь апоптоза в макрофагах *in vitro* и *in vivo* с активацией каспазы 3. Выживание *M. tuberculosis* в макрофагах организма-хозяина связывают с устойчивостью клеток к апоптозу из-за индукции антиапоптотического белка Mcl-1 из семейства Bcl-2 [74]. Ген *secA2*, кодирующий ассоциированные с вирулентностью бактериальные белки, необходим для подавления апоптоза макрофагов, инфицированных *M. tuberculosis*. Инактивация *secA2* снижала продукцию микобактериальной супероксидисмутазы A (SodA), что приводило к усилению апоптоза инфицированных макрофагов. При заражении мышей *M. tuberculosis* с делецией гена *secA2* значительно повышалась активация антиген-специфичеких $CD8^+$ T- клеток, что могло быть следствием усиления апоптоз-зависимой кросс-презентации бактериальных антигенов. У *M. tuberculosis* идентифицирован также ген *nuoG*. Мутанты *M. tuberculosis* с делецией этого гена отличались усиленной способностью индуцировать апоптоз инфицированных макрофагов. Изучение таких мутантов на модели инфекции у мышей показало наличие прямой связи между способностью бактерий ингибировать апоптоз и их вирулентностью [63]. Пять из одиннадцати серин-треонин-протеинкиназ (STPKs)*:* pknE, pknG, pknH, pknI, и pknK*,* которые экспрессирует *M. tuberculosis*, обладают способностью поддерживать внутриклеточное выживание бактерий. Действие одного из этих белков PknE направлено на подавление апоптоза и способствует адаптации *M. tuberculosis* к внутриклеточному выживанию [75].

В то же время, *M. tuberculosis* может ингибировать апоптоз альвеолярных эпителиальных клеток за счет усиления продукции растворимых рецепторов TNFR-2 (sTNFR2), которые препятствуют проапоптотической активности TNF-α. Кроме того, в зараженных *M. tuberculosis* эпителиальных клетках повышается экспрессия гена, кодирующего антиапоптотический белок Bcl-2, и снижается экспрессия генов, кодирующих проапоптотические Bax- и Bad-белки [76].

Таблица 2. Влияние вирусов на пути апоптоза (по [12])
Table 2. Targeting apoptosis pathways by viruses (by [12])

Вирусы Viruses	Апоптоз Apoptosis	Механизм действия Mechanism	Клетки-мишени Cell type
Hepatitis C virus	Индукция Induction	Экзогенный путь Extrinsic pathway	Цитотоксические лимфоциты,макрофаги Cytotoxic lymphocytes, macrophages
	Ингибирование Inhibition	Ингибирование Fas- и эндогенного пути Inhibits both Fas pathway and intrinsic pathway	Гепатоциты Hepatocytes
HIV-1	Индукция Induction	Fas-путь Fas pathway	$CD4^+$ Т-лимфоциты $CD4^+$ T-lymphocytes
Rabies virus	Индукция Induction	Экспрессия Bax и каспазы 1 Expression of Bax and caspase 1	Клетки нейробластомы Neuroblastoma cell
	Индукция Induction	Nedd-2 ген каспазы, активация каспазы 8 Caspase gene Nedd-2, activation of caspase 8	Нейроны Neurons
Epstein-Barr virus	Ингибирование Inhibition	Экспрессия антиапоптотических генов Upregulation of antiapoptotic genes	В лимфоциты B lymphocytes
Human cytomegalovirus	Ингибирование Inhibition	Ингибирование Fas и опосредованного каспазами апоптоза Inhibits Fas and caspase-mediated apoptosis	Фибробласты линии MRC-5, клетки HeLa MRC-5 fibroblasts, HeLa cells
Adenovirus	Индукция Induction	Ген белка ретинобластомы Retinoblastoma gene	Клетки REF52 REF52 cells
	Ингибирование Inhibition	p53 сигнальный путь p53 pathway	Цитотоксические Т лимфоциты Cytotoxic lymphocytes

Жирным шрифтом выделены названия ДНК-содержащих вирусов.
Bold – the names of DNA viruses.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА ВИРУСАМИ

Механизмы модуляции апоптоза при вирусных инфекциях сходны с таковыми при инфекциях, вызванных облигатно внутриклеточными бактериями. Апоптотическая гибель инфицированных вирусами клеток не препятствует выживанию и успешной внутриклеточной репликации патогена. Вместе с тем, вирусы проявляют антиапоптотическую активность, чтобы сохранить клетку живой в качестве ниши для собственной репликации. И есть примеры вирусных инфекций, при которых блокада апоптоза приводит к повышению титра вирусов, что свидетельствует о возможности противовирусного эффекта апоптоза [35].

Характер влияния вирусов на апоптоз зависит от выбора клетки-мишени. Так, вирус модифицированной осповакцины (MVA) индуцировал апоптоз макрофагов и дендритных клеток, но ингибировал апоптоз эпителиальных клеток. Вирус гепатита С (HCV) индуцировал апоптоз макрофагов и цитотоксических Т-лимфоцитов, но ингибировал оба пути индукции апоптоза в гепатоцитах (табл. 2) [12].

Вирусы разных семейств, преимущественно ДНК-содержащие (в табл. 2 выделены жирным шрифтом), имеют белки, угнетающие апоптоз, для подавления или отсрочки клеточной гибели и продления жизни клеток хозяина. У некоторых ДНК-содержащих вирусов присутствуют белки, угнетающие апоптоз за счет антагонизма с проапоптотическими каспазами [3, 77]. Мишенями вирусных ингибиторов апоптоза

могут служить и другие ферменты, участвующие в механизмах апоптоза. Некоторые вирусы используют клеточные каспазы при репликации и созревании вирусных белков для облегчения выхода из клетки новых вирионов [35].

Многие вирусы подавляют апоптоз за счет регуляции экспрессии белков семейства Bcl-2. LMP1-белок оболочки EBV индуцирует повышение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и, тем самым, обеспечивает сигнал выживания инфицированных В-лимфоцитов [78]. Это позволяет EBV персистировать в В-лимфоцитах [79]. В геноме EBV закодирован собственный белок BHRF1, имеющий высокую степень гомологии с Bcl-2, который предупреждает апоптоз инфицированных клеток на начальной стадии инфекции [80]. CMV человека экспрессирует ингибитор эндогенного пути апоптоза (vMIA), цитопатический эффект которого связан с инактивацией проапоптотического белка Bax [81].

Вирусы ингибируют апоптоз за счет экспрессии антагонистов рецепторов клеточной гибели. Примером служит HSV, действие которого на клетки организма-хозяина опосредовано рецепторами семейства TNFα. Поверхностные белки HCV ингибируют Fas-опосредованный апоптоз, за счет подавления экспрессии Fas и FasL [82]. HIV (Human Immunodeficiency Viruses) проникает в клетки за счет взаимодействия белка оболочки вируса gp120 с молекулой CD4 и хемокиновым рецептором CXCR4 на Т-клетках. Взаимодействие gp120 с CD4/CXCR4-рецепторным комплексом вызывает быстрое снижение трансмембранного потенциала митохондрий в клетках с последующим выделением цитохрома С в цитозоль. Такой gp120-опосредованный апоптоз вносит существенный вклад в снижение количества CD4 Т-лимфоцитов при СПИДе [83].

У большинства вирусов выявлена проапоптотическая активность, которая часто способствует гибели иммунных клеток. Например, вирус гриппа H5N1 индуцирует экспрессию гена, кодирующего Fas и вызывает апоптоз инфицированных макрофагов. Более того, заражение клеток этим вирусом индуцирует коэкспрессию Fas и FasL на поверхности инфицированных вирусом гриппа клеток, а контакт зараженных клеток друг с другом ведет к индукции апоптоза [35].

ПОПЫТКИ ИСКУССТВЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА

В ряде случаев недостаточная активность апоптоза при инфекциях проявляется развитием аутоиммунных заболеваний. С другой стороны, усиление апоптоза клеток иммунной системы может приводить к недостаточности иммунных реакций. И в том, и в другом случае встает вопрос о поисках путей направленного регулирования процессов гибели клеток. Была выдвинута и обоснована гипотеза о возможности использования аналогов антиапоптотических и проапоптотческих белков семейства BCL-2 для искусственного управления этим процессом [2]. Были синтезированы малые молекулы – негативные или позитивные модуляторы апоптоза. Синтетически полученные аналоги белка BH3 прошли доклинические испытания в качестве возможных лечебных препаратов [7]. Доказанная антиапоптотическая активность BCL-2, способствующая росту опухолей, послужила стимулом создания препаратов, блокирующих активность этого белка. Препарат ABT-199 (Venetoclax/Venclexta), блокирующий белок BCL-2, проходит доклинические испытания в качестве противоопухолевого [84]. Разработанные аналоги белка BH3 продемонстрировали эффективность при лечении гемобластозов. Показана их эффективность и способность ингибировать активность белков семейства BCL-2 при лечении инфекции *L. pneumophila*. Позднее были получены молекулы, напрямую ингибирующие активность BAX и угнетающие апоптоз [3, 85].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в литературе накоплено большое количество данных, доказывающих, что процесс апоптоза играет важную роль в защите организма-хозяина от патогенных микроорганизмов. Апоптоз обеспечивает защиту организма от облигатно внутриклеточных паразитов. При этом уничтожение инфицированных клеток ограничивает возможности репликации возбудителей. Апоптоз инфицированных клеток препятствует диссеминации возбудителей и развитию генерализованных форм инфекции. Зараженные апоптотические клетки служат материалом для кросс-презентации микробных антигенов и индукции адаптивного иммунного ответа. Это делает процесс апоптоза важной мишенью манипуляции со стороны патогенов. Действие многих факторов патогенности направлено на подавление этого процесса и связанных с этим защитных реакций организма-хозяина. Важной стратегией патогенов является индукция апоптоза клеток иммунной системы с целью ослабления их микробицидной активности. В настоящее время проводится активная разработка новых препаратов для целенаправленной регуляции апоптоза. С учетом появления все большего количества антибиотико-резистентных штаммов и недостаточной эффективности большинства противовирусных препаратов, применение препаратов, регулирующих апоптоз для усиления защитных реакций организма-хозяина или подавления репликации и диссеминации патогена, может быть одной из новых стратегий терапии острых и хронических инфекционных процессов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была профинансирована за счет средств госбюджета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Häcker G.* Apoptosis in infection. Microbes and Infection. 20(9–10): 552–559. 2018.
2. *Strasser A., Vaux D.L.* Viewing BCL2 and cell death control from an evolutionary perspective. Cell Death Differ. 25: 13–20. 2018.
3. *Naderer T., Fulcher M.C.* Targeting apoptosis pathways in infections. J. Leukoc. Biol. 103: 275–285. 2018.
4. *Labbé K., Saleh M.* Cell death in the host response to infection. Cell Death Differ. 15(9): 1339–1349. 2008.
https://doi.org/10.1038/cdd.2008.91
5. *Lamkanfi M., Kanneganti T.D.* Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. Int. J. Biochem. Cell Biol. 42(1): 21–24. 2010.
6. *Nagata S.* Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. Annu. Rev. Immunol. 36: 489–517. 2018.
7. *Singh R., Letai A., Sarosiek K.* Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 20(3): 175–193. 2019.
8. *Lauber K., Bohn E., Krober S.M., Xiao Y.J., Blumenthal S.G., Lindemann R.K., Marini P., Wiedig C., Zobywalski A., Baksh S., Xu Y., Autenrieth I.B., Schulze-Osthoff K., Belka C., Stuhler G., Wesselborg S.* Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. Cell. 113: 717–730. 2003.
9. *Cullen S.P., Martin S.J.* Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer. Semin. Cell Dev. Biol. 39: 26–34. 2015.
10. *Philpott D.J., Sorbara M.T., Robertson S.J., Croitoru K., Girardin S.E.* NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 14(1): 9–23. 2014.
11. *Inohara N., Koseki T., del Peso L., Hu Y., Yeei C., Chen S., Carrio R., Merino J., Liu D., Ni J., Nu'nez G.* Nod1, an Apaf-1-like Activator of Caspase-9 and Nuclear Factor-kB. J. Biol. Chem. 274(21): 14560–14567. 1999.
12. *Yorulmaz H.* Apoptosis and Infections. Chapter from edited volume Cell Death – Autophagy, Apoptosis and Necrosis. Ed. *Tobias M. Ntuli*. 232–266. 2015.
13. *Blander J.M., Torchinsky M.B., Campisi L.* Revisiting the old link between infection and autoimmune disease with commensals and T helper 17 cells. Immunol. Res. 54: 50–68. 2012.

14. *Martin C.J., Peters K.N., Behar S.M.* Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. Curr. Opin. Microbiol. 17: 17–23 2014.
15. *Martin C.J., Booty M.G., Rosebrock T.R., Nunes-Alves C., Desjardins D.M., Keren I., Fortune S.M., Remold H.G., Behar S.M.* Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. Cell Host Microbe. 12(3): 289–300. 2012.
16. *Albert M.L.* Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? Nat. Rev. Immunol. 4: 223–231. 2004.
17. *Savill J., Dransfield I., Gregory C., Haslett C.* A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. Nat. Rev. Immunol. 2: 965–975. 2002.
18. *Karaji N., Sattentau Q.J.* Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. Front. Immunol. 8: 1863. 2017.
19. *Truman L.A., Ford C.A., Pasikowska M., Pound J.D., Wilkinson S.J., Dumitriu I.E., Melville L., Melrose L.A., Ogden C.A., Nibbs R., Graham G., Combadiere C., Gregory C.D.* CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. Blood. 112(13): 5026–5036. 2008.
20. *Gude D.R., Alvarez S.E., Paugh S.W., Mitra P., Yu J., Griffiths R., Barbour S.E., Milstien S., Spiegel S.* Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. FASEB J. 22(8): 2629–2638. 2008.
21. *Mueller R.B., Sheriff A., Gaipl U.S., Wesselborg S., Lauber K.* Attraction of phagocytes by apoptotic cells is mediated by lysophosphatidylcholine. Autoimmunity. 40: 342–344. 2007.
22. *Elliott M.R., Chekeni F.B., Trampont P.C., Lazarowski E.R., Kadl A., Walk S.F., Park D., Woodson R.I., Ostankovich M., Sharma P., Lysiak J.J., Harden T.K., Leitinger N., Ravichandran K.S.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature. 461(7261): 282–286. 2009.
23. *Doran A.C., Yurdagul A. Jr., Tabas I.* Efferocytosis in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 20(4): 254–267. 2020.
24. *Poon I.K.H., Lucas C.D., Rossi A.G., Ravichandran K.S.* Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nat. Rev. Immunol. 14(3): 166–180. 2014.
25. *Li W.* Eat-me signals: keys to molecular phagocyte biology and "appetite" control. J. Cell. Physiol. 227(4): 1291–1297. 2012.
26. *Park S.Y., Kim I.S.* Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance. Exp. Mol. Med. 49(5): e331. 2017.
27. *Biermann M., Maueroder C., Brauner J.M., Chaurio R., Janko C., Herrmann M., Muñoz L.E.* Surface code – biophysical signals for apoptotic cell clearance. Phys. Biol. 10(6) :065007.2013.
28. *Ackerman A.L., Cresswell P.* Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. Nat. Immunol. 5(7): 678–684. 2004.
29. *Kurts C., Robinson B.W., Knolle P.A.* Cross-priming in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 10: 403–414. 2010.
30. *Segura E., Villadangos J.A.* A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. Traffic. 12: 1677–1685. 2011.
31. *Joffre O.P., Segura E., Savina A., Amigorena S.* Cross-presentation by dendritic cells. Nat. Rev. Immunol. 12: 557–569. 2012.
32. *Nair-Gupta P., Blander J.M.* An updated view of the intracellular mechanisms regulating cross-presentation. Front. Immunol. 4: 401. 2013.
33. *Bedoui S., Greyer M.* The role of dendritic cells in immunity against primary herpes simplex virus infections. Front. Microbiol. 5: 533. 2014.
34. *Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj N.* Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature. 392: 86–89. 1998.
35. *Nainu F., Shiratsuchi A., Nakanishi Y.* Induction of Apoptosis and Subsequent Phagocytosis of Virus-Infected Cells as an Antiviral Mechanism. Front. Immunol. 8: 1220. 2017.
36. *Bosnjak L., Miranda-Saksena M., Koelle D.M., Boadle R.A., Jones C.A., Cunningham A.L.* Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. J. Immunol. 174: 2220–2227. 2005.
37. *Arrode G., Boccaccio C., Lulé J., Allart S., Moinard N., Abastado J.P., Alam A., Davrinche C.* Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells. J. Virol. 74(21): 10018–10024. 2000.
38. *Larsson M., Fonteneau J.F., Lirvall M., Haslett P., Lifson J.D., Bhardwaj N.* Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus. AIDS.16(10): 1319–1329. 2002.
39. *Larsson M., Fonteneau J.F., Somersan S., Sanders C., Bickham K., Thomas E.K., Mahnke K., Bhardwaj N.* Efficiency of cross presentation of vaccinia virus derived antigens by human dendritic cells. Eur. J. Immunol. 31: 3432–3442. 2001.

40. *Schaible U.E., Winau F., Sieling P.A., Fischer K., Collins H.L., Hagens K., Modlin R.L., Brinkmann V., Kaufmann S.H.* Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. Nat. Med. 9(8): 1039–1046. 2003.
41. *Yrlid U., Wick M.J.* Salmonella-induced Apoptosis of Infected Macrophages Results in Presentation of a Bacteria-encoded Antigen after Uptake by Bystander Dendritic Cells. J. Exp. Med. 191(4): 613–623. 2000.
42. *Winau F., Weber S., Sad S., de Diego J., Hoops S.L., Breiden B., Sandhoff K., Brinkmann V., Kaufmann S.H., Schaible U.E.* Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. Immunity. 24(1): 105–117. 2006.
43. *Schulz O., Sousa C.R.* Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8aþ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. Immunology. 107: 183–189. 2002.
44. *Torchinsky M.B., Garaude J., Blander J.M.* Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger. Curr. Opin. Immunol. 22(1): 55–62. 2010.
45. *Torchinsky M.B., Garaude J., Martin A.P., Blander J.M.* Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. Nature. 458(7234): 78–82. 2009.
46. *Penteado L.A., Dejani N.N., Verdan F.F., Orlando A.B., Nino V.E., Dias F.N., Salina A.C.G., Medeiros A.I.* Distinctive role of efferocytosis in dendritic cell maturation and migration in sterile or infectious conditions. Immunology. 151(3): 304–313. 2017.
47. *Brokatzky D., Dörflinger B., Haimovici A., Weber A., Kirschnek S., Vier J., Metz A., Henschel J., Steinfeldt T., Gentle I.E., Häcker G.* A non-death function of the mitochondrial apoptosis apparatus in immunity. The EMBO J. 1–13. 2019.
48. *Ichim G., Lopez J., Ahmed S.U., Muthalagu N., Giampazolias E., Delgado M.E., Haller M., Riley J.S., Mason S.M., Athineos D., Parsons M.J., van de Kooij B., Bouchier-Hayes L., Chalmers A.J., Rooswinkel R.W., Oberst A., Blyth K., Rehm M., Murphy D.J., Tait S.W.G.* Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death. Mol. Cell. 57: 1–13. 2015.
49. *Tait S.W.G., Parsons M.J., Llambi F., Bouchier-Hayes L., Connell S., Muñoz-Pinedo C., Green D.R.* Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. Dev. Cell. 18(5): 802–813. 2010.
50. *Birge R.B., Boeltz S., Kumar S., Carlson J., Wanderley J., Calianese D., Barcinski M., Brekken R.A., Huang X., Hutchins J.T., Freimark B., Empig C., Mercer J., Schroit A.J., Schett G., Herrmann M.* Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. Cell Death Differ. 23(6): 962–978. 2016.
51. *Penberthy K.K., Ravichandran K.S.* Apoptotic cell recognition receptors and scavenger receptors. Immunol. Rev. 269(1): 44–59. 2016.
52. *Blander J.M.* The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. Immunol. Rev. 277(1): 158–173. 2017.
53. *Greenlee-Wacker M.C.* Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. Immunol. Rev. 273(1): 357–370. 2016.
54. *Kobayashi S.D., Voyich J.M., Braughton K.R., DeLeo F.R.* Down-Regulation of Proinflammatory Capacity During Apoptosis in Human Polymorphonuclear Leukocytes. J. Immunol. 170: 3357–3368. 2003.
55. *Tsatsaronis J.A., Ly D., Pupovac A., Goldmann O., Rohde M., Taylor J.M., Walker M.J., Medina E., Sanderson-Smith M.L.* Group A *Streptococcus* Modulates Host Inflammation by Manipulating Polymorphonuclear Leukocyte Cell Death Responses. J. Innate Immun. 7: 612–622. 2015.
56. *McDougal C.E., Sauer J.-D. Listeria monocytogenes*: The Impact of Cell Death on Infection and Immunity. Pathogens. 7(1): 8. 2018.
57. *Simran B., Gao P., Shen X., Fiscus V., Zong W.X., Chen L., Luo Z.Q. Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. PNAS. 104(12): 5121–5126. 2007.
58. *Behar S.M., Divangahi M., Remold H.G.* Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? Nat. Rev. Microbiol. 8: 668–674. 2010.
59. *Behar S.M., Martin C.J., Nunes-Alves C., Divangahi M., Remold H.G.* Lipids, apoptosis, and crosspresentation: links in the chain of host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. Microbes Infect. Inst. Pasteur. 13(8–9): 749–756. 2011.
60. *Divangahi M., Chen M., Gan H., Desjardins D., Hickman T.T., Lee D.M., Fortune S., Behar S.M., Remold H.G. Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. Nat. Immunol. 10(8): 899–906. 2009.
61. *Kwinn L.A., Nizet V.* How Group A *Streptococcus* circumvents host phagocyte defenses. Future Microbiol. 2(1): 75–84. 2007.
62. *Ali M., Abdallah M.S., Jere S.A.* Bacterial strategy of invading host immune system: A review. Clin. Res. Immunol. 2(1): 1–7. 2019.
63. *Hinchey J., Lee S., Jeon B.Y., Basaraba R.J., Venkataswamy M.M., Chan J., Braunstein M., Orme I.M., Derrik S.C., Morris S.L., Jakobs W.R. Jr., Porcelli S.A.* Enhanced priming of adaptive immunity

by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Investig. 117(8): 2279–2288. 2007.

64. *Keane J., Remolg H.G., Kornfeld H.* Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Strains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages. J. Immunol. 164: 2016–2020. 2000.
65. *Ruckdeschel K., Pfaffinger G., Haase R., Sing A., Weighardt H., Häcker G., Holzmann B., Heesemann J.* Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. J. Immunol. 173(5): 3320–3328. 2004.
66. *Zhang Y., Ting A.T., Marcu K.B., Bliska J.B.* Inhibition of MAPK and NF-B Pathways Is Necessary for Rapid Apoptosis in Macrophages Infected with *Yersinia*. J. Immunol. 174: 7939–7949. 2005.
67. *Massari P., Ram S., Macleod H., Wetzler L.M.* The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. Trends Microbiol. 11(2): 87–93. 2003.
68. *Yamasaki E., Wada A., Kumatori A., Nakagawa I., Funao J., Nakayama M., Hisatsune J., Kimura M., Moss J., Hirayama T.* Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. J. Biol. Chem. 281(16): 11250–11259. 2006.
69. *Matsumoto A., Isomoto H., Nakayama M., Hisatsune J., Nishi Y., Nakashima Y., Matsushima K., Kurazono H., Nakao K., Hirayama T., Kohno S. Helicobacter pylori* VacA Reduces the Cellular Expression of STAT3 and Pro-survival Bcl-2 Family Proteins, Bcl-2 and Bcl-XL, Leading to Apoptosis in Gastric Epithelial Cells. Dig. Dis. Sci. 56: 999–1006. 2011.
70. *Hamada S., Kawabata S., Nakagawa I.* Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*. Proc. Jap. Ac. Phys. Biol. Sci. 91(10): 539–559. 2015.
71. *Timmer A.M., Timmer J.C., Pence M.A., Hsu L.C., Ghochani M., Frey T.G., Karin M., Salvesen G.S., Nizet V.* Streptolysin O Promotes Group A *Streptococcus* Immune Evasion by Accelerated Macrophage Apoptosis. J. Biol. Chem. 284(2): 862-871. 2009.
72. *Ashida H., Mimuro H., Ogawa M., Kobayashi T., Sanada T., Kim M., Sasakawa C.* Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. J. Cell. Biol. 195(6): 931–942. 2011.
73. *Faherty C.S., Maurelli A.T.* Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. Trends in Microbiol. 16(4): 173–180. 2008.
74. *Sly L.M., Hingley-Wilson S.M., Reiner N.E., McMaster W.R.* Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. J. Immunol. 170(1): 430–437. 2003.
75. *Parandhaman D.K., Narayanan S.* Cell death paradigms in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4: 31. 2014.
76. *Danelishvili L., McGarvey J., Li Y.J., Bermudez L.E. Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. Cell. Microbiol. 5(9): 649–660. 2003.
77. *Best S.M.* Viral Subversion of Apoptotic Enzymes: Escape from Death Row. Annu. Rev. Microbiol. 62: 171–192. 2008.
78. *Wang S., Rowe M., Lundgren E.* Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. Cancer Res. 56(20): 4610–4613. 1996.
79. *Rowe M., Peng-Pilon M., Huen D.S., Hardy R., Croom-Carter D., Lundgren E., Rickinson A.B.* Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. J. Virol. 68(9): 5602–5612. 1994.
80. *Desbiena A.L., Kapplera J.W., Marracka P.* The Epstein–Barr virus Bcl-2 homolog, BHRF1, blocks apoptosis by binding to a limited amount of Bim. PNAS. 106(14): 5663–5668. 2009.
81. *Pauleau A.L., Larochette N., Giordanetto F., Scholz S.R., Poncet D., Zamzami N., Goldmacher V.S., Kroemer G.* Structure–function analysis of the interaction between Bax and the cytomegalovirus-encoded protein vMIA. Oncogene. 26: 7067–7080. 2007.
82. *Zhou X., Jiang W., Liu Z., Liu S., Liang X.* Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. Viruses. 9(11): 316. 2017.
83. *Roggero R., Robert-Hebmann V., Harrington S., Roland J., Vergne L., Jaleco S., Devaux C., Biard-Piechaczyk M.* Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. J. Virol. 75(16): 7637–7650. 2001.
84. *Schenk R.L., Strasser A., Dewson G.* BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target. Biochem. Biophys. Res. Commun. 482(3): 459–469. 2017.
85. *Letai A.* S63845, an MCL-1 Selective BH3 Mimetic: Another Arrow in Our Quiver. Cancer Cell. 30(6): 834–835. 2016.

Apoptosis in Infection

I. S. Freidlin[a, b, *], J. T. Mammedova[a], and E. A. Starikova[a, b]

[a] *Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia*
[b] *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia*
**e-mail: irinaf-n@yandex.ru*

Apoptosis is a normal physiological process aimed at regulating the size of cells populations by maintaining a balance between cell survival and death. In bacterial and viral infections, apoptosis can be considered as a way to protect the host, responsible for eliminating infected cells without inducing an inflammatory response. Apoptosis is involved in the resolution of inflammation, providing an anti-inflammatory effect. As one of the factors of antimicrobial immunity, apoptosis can help to clear the body from pathogens and provides a material for cross-presentation of microbial antigens to induction of an adaptive immune response. Pathogenic microorganisms use a variety of strategies to regulate apoptosis during their survival and reproduction in the host body. By inducing apoptosis bacteria and viruses contribute to the elimination of protective immune cells. At the same time, by suppressing the processes of apoptosis, pathogens can avoid attacks from the host immune system cells and maintain the replication niches necessary for their survival. The development of drugs for targeted artificial regulation of apoptosis processes opens up new opportunities for the treatment of infectious diseases.

Keywords: apoptosis, infections, immune response

ЦИТИРОВАТЬ:

Фрейдлин И.С., Маммедова Д.Т., Старикова Э.А. Роль апоптоза при инфекциях. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1479–1495.

DOI: 10.31857/S0869813920120043

TO CITE THIS ARTICLE:

Freidlin I.S., Mammedova J.T., Starikova E.A. Apoptosis in Infection. Russian Journal of Physiology. 106(12): 1479–1495.

DOI: 10.31857/S0869813920120043

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1496–1511

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕТЧАТКИ У МЫШЕЙ С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ

© 2020 г. А. А. Горяченков[1], А. Ю. Ротов[1, *], М. Л. Фирсов[1]

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

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

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.
После доработки 27.09.2020 г.
Принята к публикации 05.10.2020 г.

Стандартным модельным объектом для исследования наследственных патологий сетчатки являются мыши линии C3H, имеющие мутацию в гене *Pde6b*. У таких животных нарушается работа фосфодиэстеразы палочек, что приводит к гибели фоторецепторов и полной потере зрения к 4-й неделе жизни. Было показано, что у мышей C3H, происходящих из питомников “Charles River Laboratories” – линии C3H/Crl – встречается дополнительная мутация в гене *Gpr179*, которая приводит к нарушению работы трансдукционного каскада ON-биполярных клеток сетчатки. Несмотря на широкое распространение мышей линии C3H/Crl в качестве объектов исследований, детального изучения особенностей процесса дегенерации фоторецепторов до сих пор не проводилось. Целью данной работы было изучение временной динамики морфологических и функциональных изменений, происходящих в раннем возрасте в сетчатке мышей линии C3H/Crl. В качестве контрольной группы были взяты мыши дикого типа – линии C57Bl/6J. Для оценки функционального состояния сетчатки использовали метод электроретинографии *in vivo*, морфологический анализ проводили на гистологических препаратах тканей глаза. Показано, что у мышей линии C3H/Crl ответы сетчатки на световую стимуляцию лишены вклада палочек и ON-биполярных клеток в течение всего периода измерений, начиная с 18-го дня жизни, а ответ колбочек исчезает к 25-му дню. Количество фоторецепторов и нейронов внутреннего ядерного слоя сетчатки у мышей линии C3H/Crl оказывается сниженным уже к 16-му дню жизни, а к 25-му дню фоторецепторы почти полностью дегенерируют. В то же время было показано, что амплитуда ответов и чувствительность сетчатки мышей дикого типа не претерпевают значимых изменений в раннем возрасте. Полученные данные позволяют составить картину развития патологии сетчатки у животных линии C3H/Crl.

Ключевые слова: сетчатка, фоторецептор, ON-биполярная клетка, наследственное заболевание сетчатки, пигментный ретинит, электроретинограмма

DOI: 10.31857/S0869813920120055

Термином “пигментный ретинит” (ПР) обозначается группа наследственных заболеваний со сходной клинической картиной, которые характеризуются прогрессирующей дегенерацией фоторецепторных клеток и нарушениями в функционировании пигментного эпителия сетчатки. Среди наследственных заболеваний ПР является наиболее распространенной причиной потери зрения и имеет распространенность во всем мире от 1 : 3000 до 1 : 7000 человек [1]. Как правило, патоло-

гическое состояние развивается в два этапа: на начальной стадии происходит гибель палочек, прогрессирующая от периферии к центру, что проявляется как потеря зрения в темное время суток; в дальнейшем погибают колбочки, в результате чего поле зрения сужается, и затем наступает полная слепота [2, 3].

В настоящее время активно изучаются механизмы, приводящие к дегенерации фоторецепторов, а также разрабатываются подходы к замедлению этого процесса или частичной компенсации зрительной функции после ее потери [4–6]. Классическим модельным объектом для изучения ПР являются мыши, выведенные на основе обнаруженной в 1924 г. природной популяции с патологическим фенотипом, получившим обозначение “rd1" (retinal degeneration type 1, дегенерация сетчатки 1 типа) [7, 8]. Было показано, что причиной гибели фоторецепторов у этих животных является мутация в гене, кодирующем β-субъединицу фосфодиэстеразы 6 типа (Pde6b), которая регулирует внутриклеточную концентрацию циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в палочках [9]. Данная мутация включает в себя два изменения в нуклеотидной последовательности гена: вставку ретровирусного геномного фрагмента в 1-ом интроне (8.5 тысяч п.о.) и нонсенс-мутацию в 7-ом экзоне, приводящую к синтезу укороченного, нефункционального белка [10, 11].

Согласно морфологическим данным, у мышей с фенотипом rd1 подавляющее большинство палочек погибает в период с 8-го по 20-й день жизни, что, в свою очередь, приводит к уменьшению амплитуды электрических ответов и чувствительности сетчатки к свету по сравнению со здоровой сетчаткой [12]. Примечательно, что на 18-й день жизни ответы колбочек соответствуют таковым у здоровой сетчатки, это говорит о том, что на данном этапе они оказываются не затронутыми процессом дегенерации. Однако вскоре после полной потери палочек происходит и стремительная дегенерация колбочек, причины которой к настоящему времени остаются неясными [12, 13].

Наиболее часто при изучении особенностей фенотипа rd1 или апробации терапевтических подходов используются лабораторные мыши C3H. Существует несколько линий C3H, реализуемых различными питомниками и различающихся по генетическому фону. Было обнаружено, что у животных из питомника “Charles River Laboratories” (линия 3H/Crl), а также в нескольких его региональных подразделениях, присутствует дополнительная мутация в гене *Gpr179* [14]. Этот ген кодирует орфанный рецептор, связанный с G-белком, который является важной частью сигнального каскада ON-биполярных клеток сетчатки. Ретровирусная вставка в 1-ом интроне гена (6.5 тысяч п.о.) приводит к нарушению синтеза белка и потере функциональности каскада [15]. Таким образом, у мышей линии C3H/Crl, помимо прогрессирующей гибели фоторецепторов, нарушается работа ON-биполярных клеток, что существенно отличает их от фенотипа rd1.

Несмотря на широкое распространение линии C3H, детального изучения особенностей процесса дегенерации фоторецепторов у мышей этой линии не проводилось, что ставит под вопрос соответствие результатов, получаемых на этих животных, стандартной модели ПР [16]. Вследствие этого остается неизвестным, в каких аспектах они соответствуют стандартному фенотипу ПР rd1, а в каких – отличаются. Известно, что патологический процесс у мышей с фенотипом rd1 не ограничивается гибелью фоторецепторных клеток, а включает в себя морфологические перестройки других клеток сетчатки (см. обзор [17]). Наиболее сильные изменения происходят в нейронах внутреннего ядерного слоя, т.е., в том числе и в ON-биполярных клетках. Поэтому разумно будет предположить, что мутация в гене *Gpr179*, приводящая к потере функциональной связи биполярных клеток с фоторецепторами, может повлиять на эти перестройки на ранних этапах дегенерации, когда зрительная функция еще сохраняется.

В данной работе была изучена временная динамика морфологических и функциональных изменений сетчатки в раннем возрасте у мышей линии C3H/Crl в сравнении с контрольными животными дикого типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект, схема эксперимента

В качестве экспериментальной группы животных с мутациями в генах *Pde6b* и *Gpr179* использовались мыши линии C3H/Crl (питомник Пущино, Московская область).

В качестве контрольной группы животных без нарушений зрительной функции использовались мыши линии C57Bl/6J (питомник Рапполово, Ленинградская область). Работа была проведена с соблюдением принципов гуманности (Директивы Совета Европейских сообществ 1986 г. 86/609/EEC), одобренных биоэтическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН. Животные содержались в стандартных условиях при 12-часовом световом цикле с неограниченным доступом к воде и корму.

Экспериментальная часть работы состояла из трех этапов: генотипирования, гистологического анализа морфологического состояния сетчатки и электрофизиологического анализа функционального состояния сетчатки. Забор проб ДНК мышей, прибывших из питомника, и генотипирование проводились перед скрещиванием животных для получения потомства. У родившихся мышат отслеживалась возрастная динамика изменений электрограммы (ЭРГ) в раннем возрасте: с момента открытия глаз (17–18-й день после рождения), на 18-й, 20-й, 22-й и 25-й день после рождения, к которому, согласно данным литературы, полностью теряют зрение мыши с фенотипом rd1 [12]. Также на 16-й и 25-й дни жизни у некоторых животных производился забор препаратов сетчатки для последующего гистологического анализа. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

Генотипирование

Выделение ДНК. Перед проведением основного экспериментального протокола было проверено соответствие генов *Pde6b* и *Gpr179* мутантной аллели или дикому типу у линейных животных. Для выделения ДНК из фрагментов мышиных хвостов длиной 1–1.5 мм использовался метод HotSHOT [18]. Образцы ткани инкубировали в 50 мкл лизирующего буфера (25 мМ NaOH + 0.2 мМ EDTA) в течение 60 мин при 95°C, затем добавляли 50 мкл нейтрализующего буфера (40 мМ Трис-HCl). Все компоненты буферов были приобретены у Sigma-Aldrich, США. До проведения дальнейших манипуляций пробы с ДНК хранились при температуре –20°C.

Полимеразная цепная реакция. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) по данным литературы были подобраны праймеры, специфичные либо к мутантной аллели, либо к аллели дикого типа для генов *Pde6B* и *Gpr179*. В зависимости от того, для каких конкретных праймеров происходит отжиг на матрицу ДНК, образуются продукты разной длины. Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

Для проведения ПЦР к 3 мкл раствора исследуемого образца геномной ДНК добавляли 17 мкл реакционной смеси следующего состава: Taq M-ДНК-полимераза, 0.1 е. а.; буфер для Taq M-полимеразы, 70 мМ Трис-HCl, pH 8.6, 16.6 мМ $(NH_4)_2SO_4$; раствор $MgCl_2$, 4 мМ (все – Алкор-Био, Россия); смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, каждый по 0.25 мМ (Медиген, Россия); прямой и обратные праймеры для мутантной аллели и дикого типа, каждый по 0.8 мкМ (ДНК-синтез, Россия). Амплификацию проводили в термоциклере Mastercycler Personal (Eppendorf,

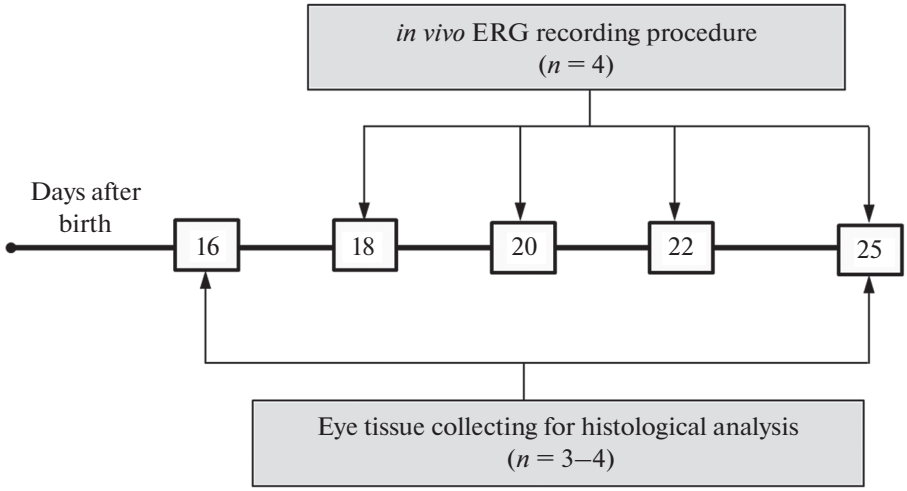


Рис. 1. Схема эксперимента. Исследовали динамику функционального и морфологического состояния сетчатки у мышей в раннем возрасте. Для обеих линий (C57Bl/6J и C3H/Crl) мышей несколько животных проходили процедуру регистрации ЭРГ 4 раза: на 18-й, 20-й, 22-й и 25-й день жизни. Отдельно, у других мышей, на 16-й и 25-й дни жизни производили забор препаратов глаз для последующего гистологического анализа.

Fig. 1. Schematic outline of study. We studied the dynamics of retinal functionality and morphology in mice at an early age. Several animals from both mouse strains (C57Bl/6J and C3H/Crl), were used for ERG registration 4 times: on 18th, 20th, 22th and 25th days of postnatal life. Separately, on 16th and 25th days of postnatal life, eye tissues were collected for further histological analysis.

Германия) по программе, включавшей “горячий старт” – 95°C, 3 мин, и 45 циклов: денатурация – 95°C, 15 с, отжиг праймеров – 63°C, 20 с, элонгация – 72°C, 45 с.

Гель-электрофорез. После завершения ПЦР проводился электрофорез продуктов амплификации в 2%-ном агарозном геле на трис-ацетатном буфере (Thermo Fisher Scientific, США). Для визуализации ампликонов ДНК с помощью системы Chemi-Doc MP Imaging System (Bio-rad Laboratories, США) в гель добавлялся бромистый этидий (1.4 мкг/мл, Хеликон, Россия).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для генотипирования
Table 1. Nucleotide sequences of primers used for genotyping

Ген Gene	Прямой праймер (5'→3') Forward primer (5'→3')	Обратный праймер (5'→3') Reverse primer (5'→3')	Размер продукта, п.о. Product size, bp	Ссылка на лит. источник Ref.
Gpr179	TGTGCCTGGG-TATCTGTTGA	*Wild type* GCTTACACACTTACACACAGA-TAGAT	100	[16]
		Mutant allele GCATGTGCCAAGGGTATCTT	400	
Pde6b	TGACAAT-TACTCCTTTTCCCT-CAGTCTG	*Wild type* TACCCACCCTTCCTAATTTTTCT-CACGC	400	[19]
		Mutant allele GTAAACAGCAAGAG-GCTTTATTGGGAAC	550	

Электрофизиологический анализ

Регистрация ответов сетчатки на свет. Для оценки функционального состояния сетчатки использовался метод электроретинографии *in vivo*, позволяющий регистрировать изменение потенциала на роговице, возникающее вследствие ответов сетчатки на световые стимулы.

Мыши проходили предварительную темновую адаптацию в течение 12 ч, после чего на время эксперимента наркотизировались с помощью наркозного аппарата Minor Vet (Zoomed, Россия) газовой смесью изофлурана (2.5%, Laboratorios Karizoo, Испания) и кислорода. Все манипуляции с животными проводились в темноте с использованием красных фонарей.

На оба глаза животного предварительно наносили местный анестетик оксибупрокаин (инокаин 0.4%-ный раствор, Сентисс Рус, Россия) и расширитель зрачка тропикамид (мидримакс 0.8%-ный раствор, Сентисс Русс, Россия). ЭРГ регистрировали с помощью волосковых серебряных электродов, помещенных на роговицу левого глаза (стимулируется светом) и на роговицу правого глаза (держится в темноте). Заземляющий электрод подкожно закрепляли под холкой животного. Система световой стимуляции включала в себя два независимых канала на основе одинаковых светодиодов с максимумом излучения λ_{max} 525 нм, контроль интенсивности осуществлялся с помощью серых нейтральных светофильтров и тока светодиода. Сигнал с электродов через усилитель (Model 3000, A-M Systems, США) с аналоговым низкочастотным фильтром 3 кГц записывали с частотой дискретизации 1 мс/точку. Запись данных, а также управление временем подачи, длительностью и интенсивностью стимулов во время эксперимента осуществляли при помощи плат и программ LabView (National Instruments, Austin, TX).

Экспериментальный протокол. На первом этапе проводилась регистрация электрических ответов на короткие (10–100 мс) вспышки с возрастающей интенсивностью у животного в состоянии темновой адаптации. На втором этапе стимуляции включали постоянную фоновую засветку интенсивностью 25.4 кд/м^2, переводящую палочки в насыщенное состояние (см. протокол [20]). По прошествии 8–10 мин, необходимых для световой адаптации сетчатки, регистрировали ответы на вспышки света по тому же протоколу, что и на первом этапе, но при включенном фоне. Таким образом, выделялась компонента ЭРГ, отражающая работу исключительно колбочек. Палочковую компоненту ЭРГ вычисляли как разность между ответом темноадаптированного животного и соответствующим ответом, записанном при фоновой засветке.

Последующая обработка записанных ответов включала корректировку нулевой линии и дополнительную фильтрацию (низкочастотный фильтр Бесселя 30 Гц). Затем определялись экстремальные точки, соответствующие пикам основных компонентов ЭРГ: нисходящей a-волне (отражает ответ фоторецепторов) и восходящей b-волне (отражает ответ ON-биполярных клеток). Амплитуду для a-волны отсчитывали от нулевой линии, а для b-волны – от пика a-волны. В случае, если эти компоненты невозможно было выделить на фоне шума, их амплитуду для дальнейшего анализа считали равной нулю.

Гистологический анализ. Для получения препаратов сетчатки мыши умерщвлялись путем цервикальной дислокации. После выделения глаз у них срезали переднюю камеру и удаляли хрусталик. Полученные глазные бокалы фиксировали в глутаровом альдегиде (1% в 0.1 М фосфатном буфере) в течение 1.5 ч и затем в параформальдегиде (2% в 0.1 М фосфатном буфере) – 12 ч. Далее препараты подвергали отмывке в фосфатном буфере, дегидратации в этаноле и заливке в акриловую смолу LR White (Sigma-Aldrich, США) согласно протоколу, описанному ранее [21].

С помощью ультрамикротома LKB 4800A (LKB Produkter AB, Швеция) изготовляли срезы глазных бокалов толщиной 5–8 мкм и окрашивали их с помощью толу-

идинового синего и эозина. Для дальнейшего анализа выбирались срезы, сделанные в центральной области глазного бокала. Анализ срезов сетчатки проводился с использованием светового микроскопа Olympus BH-2 и цифрового фотоаппарата Canon E05 1000D. Для каждого среза измерялись толщины наружного и внутреннего ядерных слоев (расположение тел фоторецепторов и горизонтальных/биполярных/амакриновых клеток соответственно). Измерения проводились в области сетчатки, соответствующей ее центральной трети. Для каждого препарата глазного бокала толщины слоев сетчатки определялись как средние значения по всем изготовленным с этого препарата срезам.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программ Microsoft Excel (Microsoft Corp., США), IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corp., США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Проверку нормальности значений в выборках проводили по критерию Шапиро–Уилка.

Для сравнения параметров электрических ответов сетчатки использовали U-критерий Манна–Уитни. Для анализа морфологических параметров сетчатки применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорный критерий Тьюки для попарного анализа выборок с поправкой на множественные сравнения. Перед применением дисперсионного анализа проводилась проверка на однородность дисперсий по критерию Брауна–Форсайта. Анализ возрастной динамики параметров ЭРГ проводили с помощью критерия Фридмана для связанных выборок и апостериорного Т-критерия Уилкоксона для попарного сравнения групп.

Различия считались значимыми при уровне значимости $p \leq 0.05$. На рисунках данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего или медиана ± межквартильный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генотипирование

Для проведения типирования по генам *Pde6b* и *Gpr179* использовали реакционную смесь для ПЦР, включающую 3 праймера: единый прямой и два обратных, комплементарных к нуклеотидной последовательности либо для гена дикого типа, либо для вирусной вставки в мутантной аллели, и образующих совместно с прямым праймером продукты разной длины.

Результаты генотипирования мышей линий C57Bl/6J и C3H/Crl приведены на рис. 2. Анализ электрофореграмм для обоих исследуемых генов показал, что для проб ДНК мышей линии C57Bl/6J в ходе ПЦР амплифицируются только те фрагменты, которые соответствуют праймерам для дикого типа. Для проб ДНК мышей линии C3H/Crl, напротив, наблюдаются фрагменты, соответствующие праймерам для мутантных аллелей.

Таким образом, мы доказали, что экспериментальные животные линии C3H/Crl имеют вирусные вставки в генах *Pde6b* и *Gpr179* и соответствуют выбранной модели дегенерации сетчатки. У животных линии C57Bl/6J мутаций не выявлено, поэтому они могут использоваться в качестве контрольной группы.

Электрофизиологический анализ

Динамика амплитуды компонент ЭРГ у мышей линий C57Bl/6J и C3H/Crl

Анализ фотоответов, отражающих палочковую и колбочковую составляющие ЭРГ, показал, что уже на 18-й день жизни у мышей линии C3H/Crl форма ЭРГ значительно отличается от таковой у животных дикого типа (рис. 3). В течение всего периода регистрации ЭРГ для их ответов оказалось невозможным выделить на фоне шума a-волну палочек, а также b-волны палочек и колбочек. У мышей линии

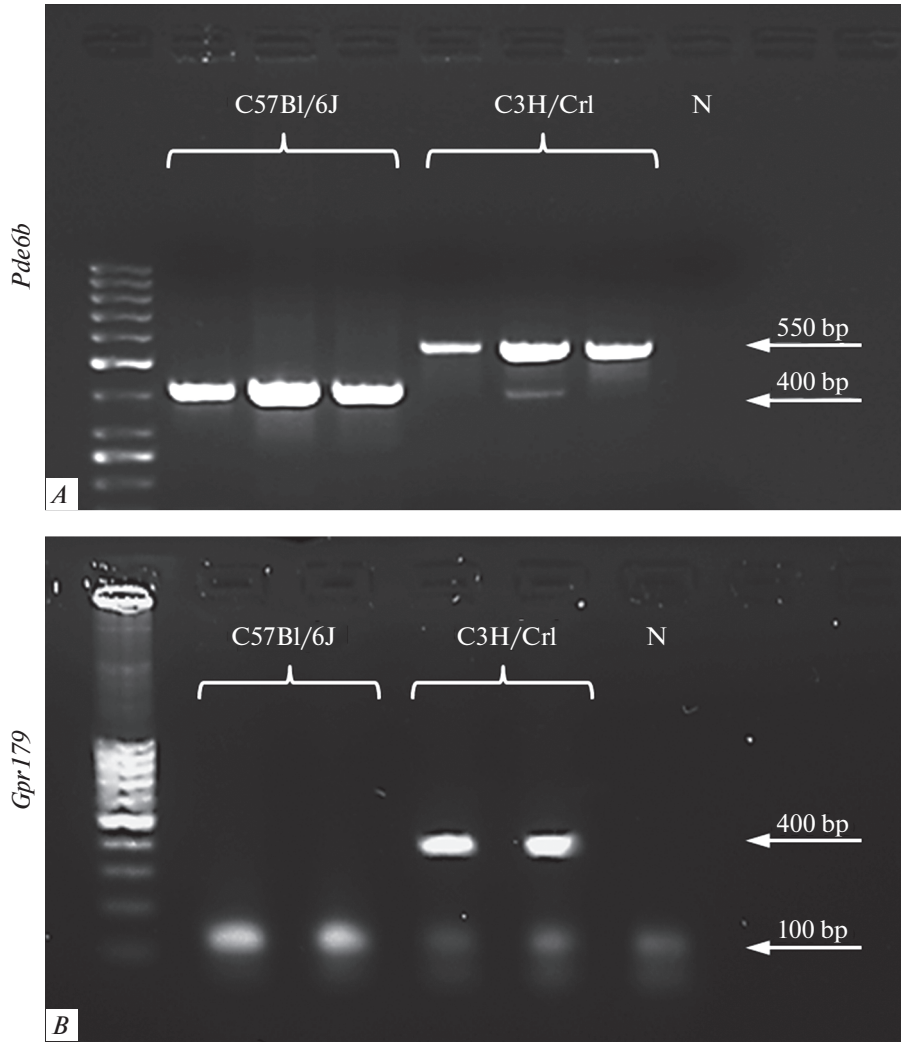


Рис. 2. Генотипирование мышей линий C57Bl/6J и C3H/Crl. *A* – электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации на 6 пробах ДНК, взятых от 3 различных мышей линии C57Bl/6J и 3 мышей линии C3H/Crl. Мыши C3H/Crl оказались гомозиготны по мутантной аллели гена *Pde6B* (продукт 550 п.о.). N – проба с отрицательным контролем; *B* – электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации на 4 пробах ДНК, взятых от 2 различных мышей линии C57Bl/6J и 2 мышей линии C3H/Crl. Результат подтверждает, что мыши линии C3H/Crl гомозиготны по мутантной аллели гена *Gpr179* (продукт 400 п.о.). N – проба с отрицательным контролем.

Fig. 2. Genotyping of C57Bl/6J and C3H/Crl mice. *A* – electrophoregram of PCR amplification products for 6 DNA samples taken from 3 different C57Bl/6J mice and 3 C3H/Crl mice. C3H/Crl mice are homozygous for the mutant allele of the *Pde6B* gene (550 bp product). N – negative control sample; *B* – electrophoregram of PCR amplification products for 4 DNA samples taken from 2 different C57Bl/6J mice and 2 C3H/Crl mice. The result confirms that C3H/Crl mice are homozygous for the mutant allele of the Gpr179 gene (product 400 bp). N – negative control sample.

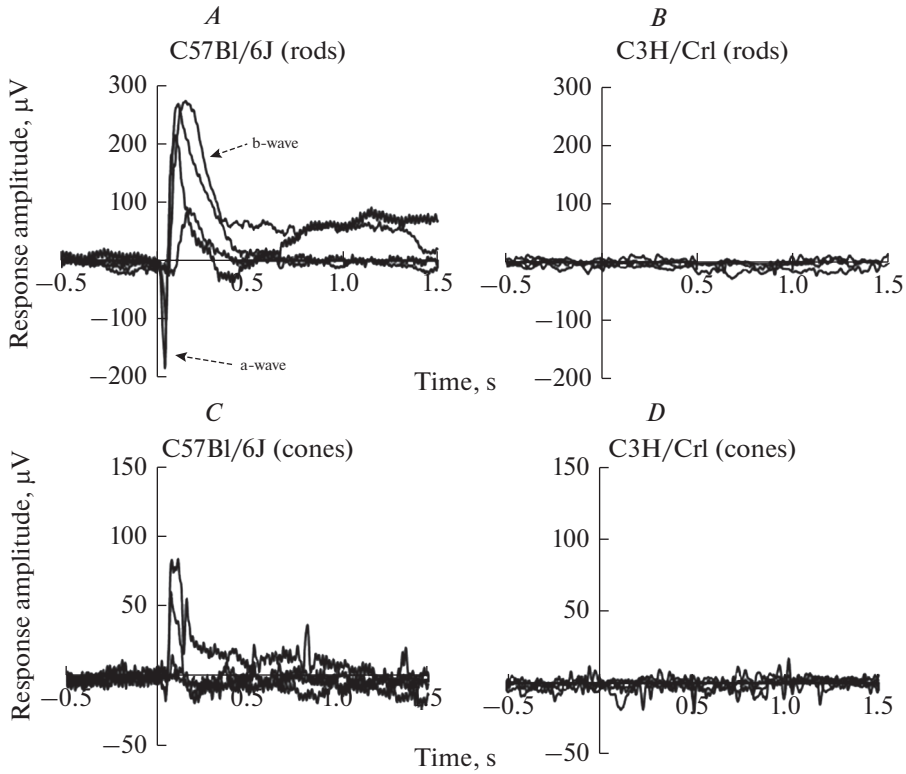


Рис. 3. Палочковые и колбочковые компоненты ЭРГ мышей линий C57Bl/6J и C3H/Crl. Приведены ответы, отражающие палочковую компоненту ЭРГ мышей линий C57Bl/6J (*A*) и C3H/Crl (*C*). Интенсивности стимулов: 0.2; 0.06; 0.006; 0.0003 кд с/м^2. Также приведены ответы, отражающие колбочковую компоненту ЭРГ мышей линий C57Bl/6J (*B*) и C3H/Crl (*D*). Интенсивности стимулов: 31.6; 6.3; 0.6; 0.06 кд с/м^2. Момент стимуляции совпадает с нулевой отметкой времени. У мышей линии C3H/Crl детектируется только колбочковая компонента а-волны.

Fig. 3. Rod- and cone-derived ERG components for C57Bl/6J and C3H/Crl mice. Representative rod-derived ERG components for C57Bl/6J (*A*) and C3H/Crl (*C*) mice. Stimuli intensity: 0.2; 0.06; 0.006; 0.0003 cd s/m^2. Representative cone-derived ERG components for C57Bl/6J (*B*) and C3H/Crl (*D*) mice. Stimuli intensity: 31.6; 6.3; 0.6; 0.06 cd s/m^2. The light stimulus was presented at the zero time moment. For C3H/Crl mice, only the cone-derived component of the a-wave can be detected.

C57Bl/6J в каждый из экспериментальных дней наблюдалась ЭРГ типичной формы, включающая все перечисленные выше компоненты (значимые отличия от мышей C3H/Crl, U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$, рис. 4*A*, *B*, *D*).

Однако у мышей линии C3H/Crl оказалась различима колбочковая компонента а-волны. Статистически значимое уменьшение ее амплитуды по сравнению с мышами дикого типа было выявлено только на 25-й день жизни (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0.03$, рис. 4*C*), но не на более ранних сроках (18-й день: $p = 0.69$, 20-й день: $p = 0.34$, 22-й день: $p = 0.2$). Примечательно, что на 25-й день жизни у всех рассматриваемых мышей линии C3H/Crl эта компонента была не детектируема на фоне шума, что свидетельствует об окончательной потере ими зрительной функции.

Дополнительно мы проанализировали временную динамику изменений амплитуды компонент ЭРГ у животных линии C57Bl/6J, сравнив значения, полученные в разные дни жизни (рис. 4). Значимых отличий не было выявлено для

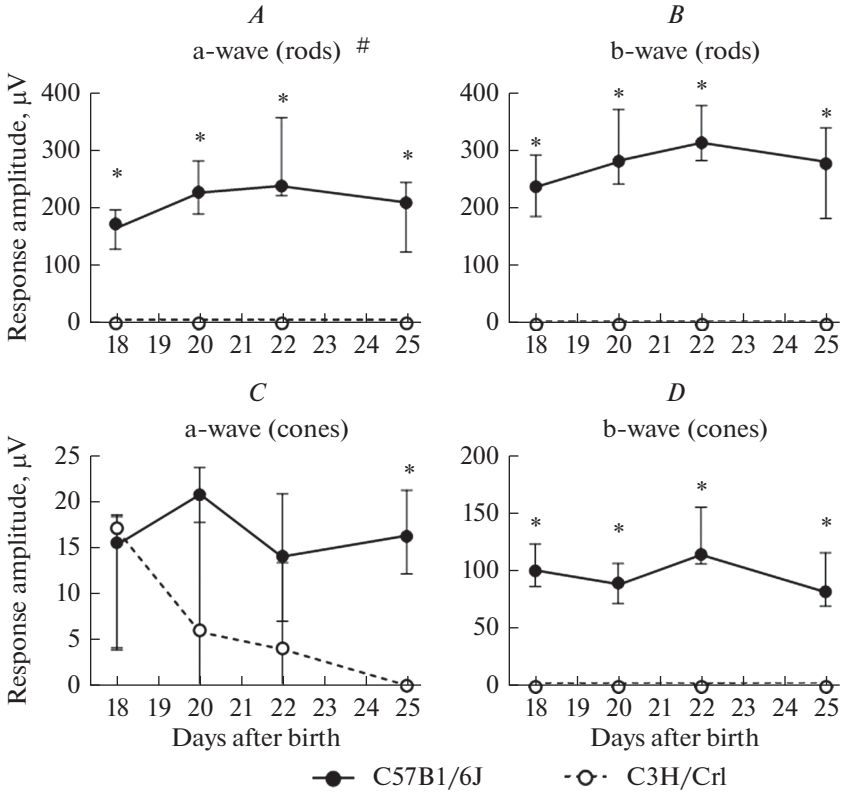


Рис. 4. Возрастная динамика амплитуды компонент ЭРГ у мышей линий C57Bl/6J и C3H/Crl. *A* – динамика палочковой a-волны, *B* – палочковой b-волны, *C* – колбочковой a-волны. Для данных компонент в каждый из экспериментальных дней амплитуда ответа у контрольных животных была значительно выше, чем у мышей C3H/Crl. *D* – динамика колбочковой b-волны. На 25-й день жизни амплитуда ответа у мышей C3H/Crl стала ниже, чем у контрольных животных. Количество животных в каждой группе $n = 4$. Статистически значимые различия между животными разных линий (U-критерий Манна–Уитни): * $p < 0.05$. Статистически значимые возрастные изменения амплитуды у мышей C57Bl/6J (критерий Фридмана для связанных выборок): # $p < 0.05$. Данные представлены в виде медиана ± межквартильный интервал.

Fig. 4. Age-related dynamics of ERG components amplitude for C57Bl/6J and C3H/Crl mice. *A* – dynamics for rod-derived a-wave, *B* – for rod-derived b-wave, *C* – for cone-derived a-wave. *D* – dynamics for cone-derived b-wave. For components *A*, *B*, *D*, on each of the experimental days, the response amplitude in the control animals was significantly higher than in the C3H/Crl mice. For cone-derived a-wave (*D*) on the 25th day of life, the amplitude of the response in C3H/Crl mice became significantly lower than in control animals. The number of animals in each group $n = 4$. Statistically significant differences between animals from different strains (Mann–Whitney U-test): * $p < 0.05$. Statistically significant age-related changes in the amplitude in C57Bl/6J mice (Friedman's test for related samples): # $p < 0.05$. Data are presented as median ± interquartile range.

a-волны колбочек (критерий Фридмана для связанных выборок, $p = 0.06$), b-волны палочек ($p = 0.19$) и b-волны колбочек ($p = 0.27$). Анализ с помощью критерия Фридмана показал наличие значимых изменений в амплитуде a-волны палочек ($p = 0.04$), однако, при попарном сравнении групп, соответствующих 18-му, 20-му, 22-му и 25-му дням жизни, статистически значимые различия не обнаружились (T-критерий Уилкоксона, $p > 0.05$).

Динамика световой чувствительности у мышей линии C57Bl/6J

Чувствительность сетчатки к свету оценивали по значениям полунасыщающих интенсивностей (ПНИ) для различных компонент ЭРГ в разные дни эксперимента. Расчет ПНИ проводили стандартным методом – путем подгонки параметров кривой, задаваемой функцией Хилла, к экспериментальным зависимостям нормированной амплитуды ответа от интенсивности стимула (рис. 5*A*) [22]. Для мышей линии C57Bl/6J мы проанализировали динамику чувствительности для трех компонентов ЭРГ: a-волны палочек, b-волны палочек и b-волны колбочек. Рассчитать ПНИ для a-волны колбочек (для животных обеих линий) не удалось, так как диапазон интенсивностей стимулов в экспериментальной установке позволял получить не более 2–3 записей ЭРГ с надежно детектируемой данной компонентой. Этого количества экспериментальных точек недостаточно для надежного описания функцией Хилла. Поскольку у мышей линии C3H/Crl три компоненты ЭРГ не наблюдаются, для них анализ изменений чувствительности также не проводили.

Статистический анализ не выявил значимых изменений величины ПНИ в течение 18–25 дней жизни у мышей дикого типа (рис. 5*B*–*D*) для a-волны палочек (критерий Фридмана для связанных выборок, $p = 0.06$), b-волны палочек ($p = 0.11$) и b-волны колбочек ($p = 0.75$).

Гистологический анализ

Забор препаратов сетчатки у мышей линии C3H/Crl производили на 16-й и 25-й дни жизни. Поскольку из данных литературы известно, что сетчатка мышей дикого типа достигает морфологически зрелого состояния к 13-му дню после рождения [23], в качестве контрольной группы для дальнейшего анализа использовали препараты, взятые у мышей линии C57Bl/6J только на 16-й день жизни (рис. 6*A*).

Однофакторный дисперсионный анализ показал, что у мышей линии C3H/Crl в возрасте 16- и 25-ти дней толщина наружного ядерного слоя меньше, чем у контрольных животных (попарные сравнения критерием Тьюки, $p < 0.001$). От 16-го к 25-му дню наружный ядерный слой сетчатки мышей C3H/Crl становится еще тоньше, в результате чего сохраняются только одиночные тела фоторецепторов (попарные сравнения по критерию Тьюки, $p = 0.02$, рис. 6*B*).

Внутренний ядерный слой, включающий тела горизонтальных, биполярных и амакриновых клеток, оказывается тоньше у мышей линии C3H/Crl обоих возрастов по сравнению с мышами линии C57Bl/6J (попарные сравнения по критерию Тьюки, $p < 0.05$). Между значениями толщины внутреннего ядерного слоя мышей C3H/Crl в возраст 16- и 25-ти дней статистически значимые различия выявлены не были (попарные сравнения по критерию Тьюки, $p = 0.88$, рис. 6*C*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мыши линии C3H с фенотипом дегенерации сетчатки rd1 являются наиболее распространенной животной моделью пигментного ретинита во многом благодаря тому, что стали исторически первыми описанными лабораторными животными с подобной патологией. Несмотря на открытие и искусственное выведение новых линий, воспроизводящих ход развития заболевания более близкий к клинической картине человека [24], мыши с фенотипом rd1 остаются востребованными для исследовательских задач. Мы предполагаем, что для этого существует две основные причины: во-первых, на данный момент механизмы дегенерации фоторецепторов при быстро развивающемся ПР остаются изученными не в полной мере. Предполагается, что ведущую роль в этом процессе играет повышение внутриклеточной концентрации цГМФ вследствие дисфункции фосфодиэстеразы палочек. Это при-

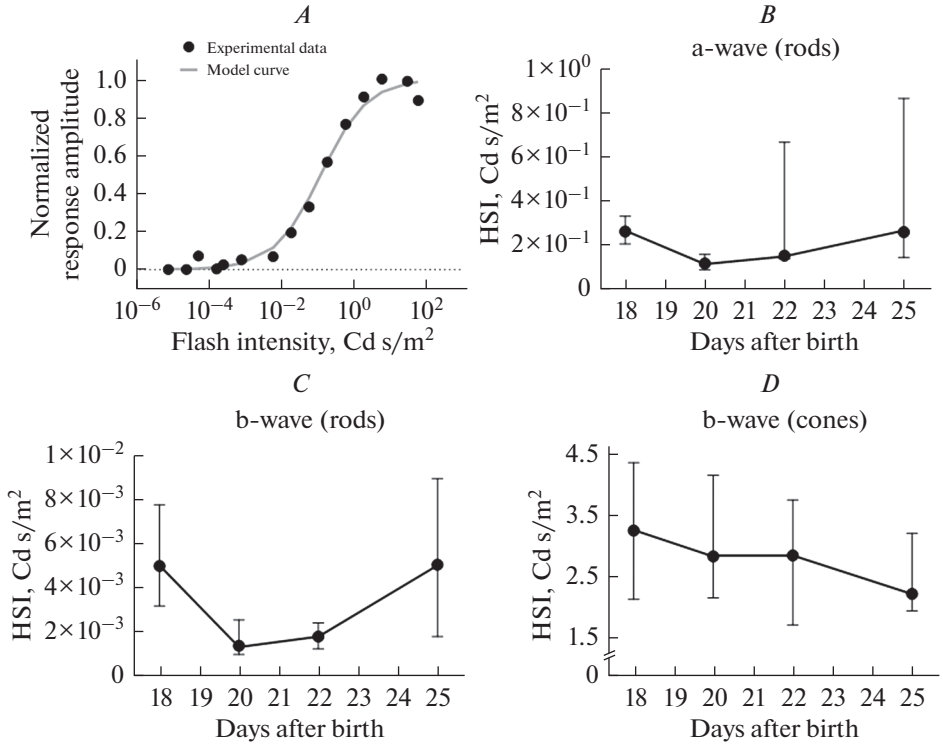


Рис. 5. Возрастная динамика чувствительности компонент ЭРГ мышей линии C57Bl/6J. *A* – пример описания экспериментальных значений нормированной амплитуды a-волны палочек функцией Хилла. Наилучшая подгонка дает значение для полунасыщающей интенсивности (ПНИ) = 0.13 кд с/м^2, коэффициент детерминации R^2 = 0.99. *B* – динамика палочковой a-волны, *C* – палочковой b-волны, *D* – колбочковой b-волны. Статистически значимых изменений ни в одном случае не обнаружено (критерий Фридмана для связанных выборок). Количество животных в каждой группе n = 4. Данные представлены в виде медиана ± межквартильный интервал.

Fig. 5. Age-related dynamics of ERG components sensitivity for C57Bl/6J and C3H/Crl mice. *A* – example fitting of normalized component amplitude data (rod-derived a-wave) by the Hill function. The best fit gives the value for the half-saturating intensity (HSI) = 0.13 cd s/m^2, the coefficient of determination R^2 = 0.99. *B* – dynamics for rod-derived a-wave, *C* – for rod-derived b-wave, *D* – dynamics for cone-derived b-wave. The number of animals in each group n = 4. Statistically significant age-related changes in the amplitude in C57Bl/6J mice (Friedman's test for related samples) were not found. Data are presented as median ± interquartile range.

водит к тому, что катионные каналы наружных сегментов палочек остаются в открытом состоянии, что ведет к повышенному входу ионов кальция в клетку и запуску механизмов апоптоза. Однако было показано, что в дегенерацию фоторецепторов вовлечены и другие процессы, заметно влияющие на скорость развития патологии: некроз палочек, развитие окислительного стресса, ответ на несвернутый белок [4, 25]. Таким образом, появляется возможность на одной модельной линии исследовать сразу несколько механизмов клеточной гибели, а также их взаимодействие друг с другом.

Во-вторых, высокая скорость дегенерации фоторецепторов у мышей rd1 оказывается полезной в рамках исследований способов возвращения зрения после его полной утраты. В ситуации, когда клетки, способные преобразовать энергию света в электрический ответ, полностью погибают, задачей терапии становится воссо-

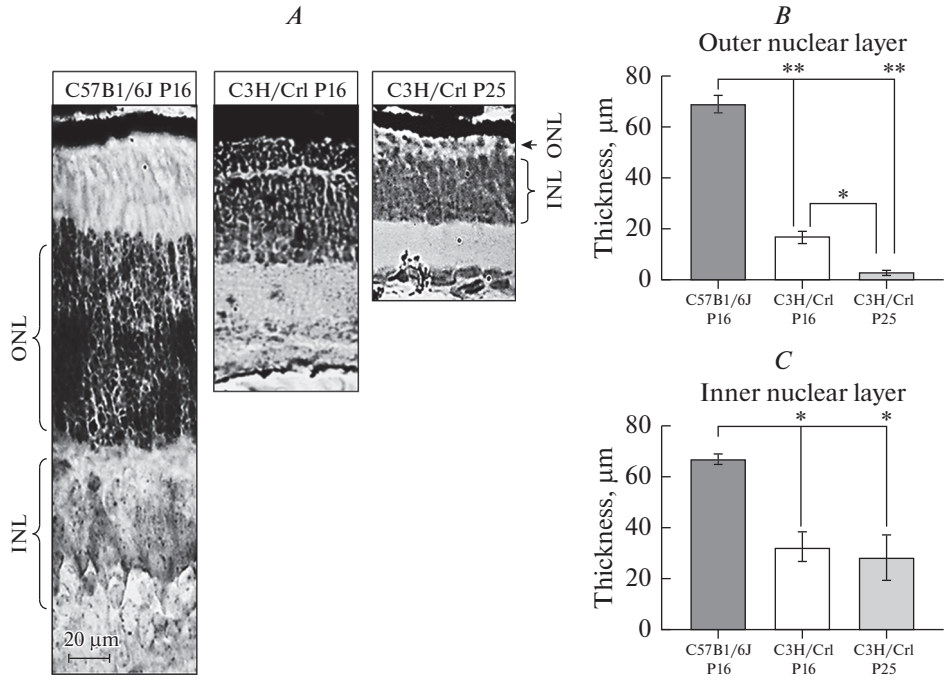


Рис. 6. Гистологический анализ срезов сетчатки мышей линий C57Bl/6J и C3H/Crl в разном возрасте. *A* – фотографии репрезентативных срезов сетчатки 16-дневной мыши C57Bl/6J, 16- и 25-дневных мышей C3H/Crl. Представлены данные для толщины наружного (*B*) и внутреннего (*C*) ядерных слоев сетчатки мышей (ONL и INL соответственно). У мышей линии C3H/Crl наблюдается дегенерация обоих ядерных слоев. Размер каждой выборки $n = 3$. Достоверные различия по критерию Тьюки: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. Данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего.

Fig. 6. Histological analysis of retinal sections for C57Bl/6J and C3H/Crl mice at different ages. *A* – photographs of representative retinal sections of 16 days old C57Bl/6J mice, 16 and 25 day old C3H/Crl mice. Data of thickness of the outer (*B*) and inner (*C*) nuclear layers of the mouse retina (ONL and INL respectively) are presented. Degeneration of both nuclear layers is observed in C3H/Crl mice. The size of each sample is $n = 3$. Significant differences according to Tukey's test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. Data are presented as mean ± standard error of the mean.

здание в сетчатке некой структуры, способной взять на себя эту функцию. Основными подходами к решению этой задачи являются протезирование с помощью светочувствительных микрочипов, введение стволовых клеток – предшественников фоторецепторов, модификация нейронов второго порядка методами оптогенетики и оптофармакологии [26–28]. Быстрое тестирование различных вариаций этих методик становится возможным благодаря тому, что мыши rd1 полностью теряют зрение уже к 4-й неделе жизни [8].

В 2015 г. Nishiguchi с соавт. обнаружили мутацию в гене *Gpr179* у мышей линии C3H/Crl после попытки применения метода генной терапии для устранения мутации в гене *Pde6b* и, соответственно, восстановлении функции фоторецепторов [14]. Было показано, что, несмотря на успешное восстановление фоторецепторной функции, ЭРГ после терапии сильно отличалась от ЭРГ здоровой сетчатки. На ней присутствовала a-волна, но b-волна по-прежнему не регистрировалась, что говорило о нарушении в работе трансдукционного каскада ON-биполярных клеток. У изученной ранее линии мышей, имеющих изолированную мутацию в гене *Gpr179*, описана аналогичная форма ЭРГ, в то время как изменений в общей мор-

фологии сетчатки и синаптических контактов между фоторецепторами и биполярными клетками не наблюдалось [15]. В дальнейшем Chang провел дополнительный скрининг нескольких линий C3H, реализуемых различными поставщиками [16]. В качестве вывода по итогам проведенного исследования автор отметил важность тщательной проверки генотипа в будущих работах, выполняемых на животных с предполагаемым фенотипом rd1. Других работ, посвященных проблеме дополнительной мутации в гене *Gpr179*, к настоящему моменту не опубликовано.

Несмотря на наличие большого количества работ, посвященных изучению процесса дегенерации фоторецепторов у мышей с мутацией в гене *Pde6b* [4, 8, 12, 23] а также нескольких исследований дисфункции ON-биполярных клеток, вызываемой мутацией в гене *Gpr179* [15, 29], совместный эффект обеих мутаций на состояние сетчатки в раннем возрасте ранее не исследовался. Помимо фундаментального интереса, эти данные могут представлять ценность для разработки подходов к протезированию сетчатки, задействующих ON-биполярные клетки [27].

Мы показали, что у мышей линии C3H/Crl с момента открытия глаз в ЭРГ отсутствуют палочковая и колбочковая компоненты b-волны, а также палочковая компонента a-волны. Этот феномен вполне ожидаемо следует из наличия у этих животных мутации в гене *Gpr179*, которая лишает функциональности каскад ON-биполярных клеток, чей ответ и составляет b-волну ЭРГ. Отсутствие a-волны палочек, в свою очередь, связано с мутацией в гене *Pde6b*, радикально снижающей активность фосфодиэстеразы – важнейшего участника каскада фототрансдукции. В колбочках экспрессируется другой тип фосфодиэстеразы, что объясняет наличие колбочкового ответа у мышей линии C3H/Crl на 18–22-й дни жизни [30]. Однако к 25-му дню жизни электрические ответы колбочек также полностью исчезают, это говорит о том, что процесс дегенерации затронул и эти рецепторы. Этот результат согласуется с данными Nishiguchi с соавт., также наблюдавшими полную потерю зрительной функции у взрослых мышей линии C3H/Crl [14]. Результаты нашего исследования можно сопоставить с работой Gibson с соавт., где приводится детальное описание функциональных изменений в сетчатке мышей с фенотипом rd1 [12]. Согласно их результатам, ответ на световую стимуляцию у таких животных пропадает к 20–21-му дню жизни, т.е. на несколько дней раньше, чем у мышей линии C3H/Crl, как следует из наших данных. Однако данное расхождение невелико и, вероятно, является следствием разного генетического фона животных, использованных в этих исследованиях, нежели влиянием мутации в гене *Gpr179*. Gibson с соавт. успешно регистрировали ЭРГ уже на 16-й день жизни, это говорит о том, что у мышей rd1 глаза открывались раньше, чем у C3H/Crl. Известно, что повышение уровня освещенности ускоряет гибель палочек у мышей с наследственной дегенерацией сетчатки, и за счет этого эффекта могло возникнуть получившееся расхождение [31].

Толщина наружного и внутреннего ядерных слоев у мышей линии C3H/Crl существенно меньше, чем у животных дикого типа уже на 16-й день жизни, это свидетельствует о том, что гибель фоторецепторов горизонтальных и биполярных клеток начинается еще до того момента, как у животного откроются глаза. К 25-му дню жизни дегенерация фоторецепторов прогрессирует, а число внутренних нейронов не претерпевает значимых изменений по сравнению с 16-ым днем. Следует отметить, что на 16-й день жизни у мышей C3H/Crl уже не наблюдается слой, соответствующий наружным сегментам палочек, это свидетельствует о том, что их развитие нарушается еще до открытия глаз животным. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными на мышах с фенотипом rd1 [8].

Уменьшение толщины внутреннего ядерного слоя позволяет предположить, что происходит частичная гибель внутренних нейронов сетчатки, что, однако, не согласуется с данными, полученными на мышах с фенотипом rd1, у которых гибель

биполярных и горизонтальных клеток происходит гораздо позже потери реакции на свет [17]. Возможным объяснением данного несоответствия может быть эффект мутации в гене *Gpr179*, ускоряющий дегенерацию биполярных клеток, а также изначально меньшее число созревающих биполяров у мышей C3H/Crl по сравнению с диким типом. Поскольку биполярные клетки созревают на поздних стадиях онтогенеза сетчатки [32], на их развитие может оказать влияние развивающийся в раннем возрасте процесс дегенерации фоторецепторов.

В работе Gibson с соавт. также было показано, что амплитуда a- и b-волны у мышей C57Bl/6J заметно возрастает в период с 16-го по 18-й день жизни, после чего вплоть до 24-го дня эти параметры не претерпевают значимых изменений [12]. Следует отметить, что авторы исследовали динамику амплитуды и чувствительности для компонент тотальной ЭРГ, не выделяя отдельно палочковую и колбочковую составляющие. Результаты нашего исследования согласуются с этими данными и дополняют их, поскольку указывают на то, что функциональное состояние как палочек, так и колбочек остается неизменным в период с 18-го по 25-й день жизни. Таким образом, исключается возможность того, что Gibson с соавт. наблюдали взаимно компенсирующие друг друга изменения в функциональном состоянии этих рецепторов и их сигнальных путей.

Полученные нами результаты позволяют составить картину развития дегенерации сетчатки у мышей линии C3H/Crl в раннем возрасте. Сравнение их с результатами, полученными другими исследователями на мышах с фенотипом rd1, позволяет предположить, что мутация в гене *Gpr179* не оказывает существенного влияния на скорость дегенерации сетчатки, однако, приводит к более ранней гибели биполярных и горизонтальных клеток.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90182.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ferrari S., Di Iorio E., Barbaro V., Ponzin D., S Sorrentino F., Parmeggiani F.* Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. Curr. Genomics. 12(4): 238–249. 2011.
2. *Hamel C.* Retinitis pigmentosa. Orphanet. J. Rare Dis. 1(1): 40. 2006.
3. *Hartong D.T., Berson E.L., Dryja T.P.* Retinitis pigmentosa. Lancet. 368(9549): 1795–1809. 2006.
4. *Sancho-Pelluz J., Arango-Gonzalez B., Kustermann S., Romero F.J., Van Veen T., Zrenner E., Ekström P., Paquet-Durand F.* Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. Mol. Neurobiol. 38(3): 253–269. 2008.
5. *Guadagni V., Novelli E., Piano I., Gargini C., Strettoi E.* Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: a laboratory perspective. Prog. Retin. Eye Res. 48: 62–81. 2015.
6. *Duncan J.L., Pierce E.A., Laster A.M., Daiger S.P., Birch D.G., Ash J.D., Iannaccone A., Flannery J.G., Sahel J.A., Zack D.J., Zarbin M.A.* Inherited retinal degenerations: current landscape and knowledge gaps. Transl. Vis. Sci. Technol. 7(4): 6–16. 2018.
7. *Keeler C.E.* The Inheritance of a retinal abnormality in white mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 10: 329–333. 1924
8. *Han J., Dinculescu A., Dai X., Du W., Smith W.C., Pang J.* The history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations. Mol. Vis. 19: 2579–2589. 2013.
9. *Bowes C., Li T., Danciger M., Baxter L.C., Applebury M.L., Farber D.B.* Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. Nature. 347: 677–680. 1990.
10. *Pittler S.J., Baehr W.* Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(19): 8322–8326. 1991.
11. *Bowes C., Li T., Frankel W.N., Danciger M., Coffin J.M., Applebury M.L., Farber D.B.* Localization of a retroviral element within the rd gene coding for the beta subunit of cGMP phosphodiesterase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90(7): 2955–2959. 1993.

12. *Gibson R., Fletcher E.L., Vingrys A.J., Zhu Y., Vessey K.A., Kalloniatis M.* Functional and neurochemical development in the normal and degenerating mouse retina. J. Comp. Neurol. 521(6): 1251–1267. 2013.
13. *Carter-Dawson L.D., LaVail M.M., Sidman R.L.* Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 17: 489-498. 1978.
14. *Nishiguchi K.M., Carvalho L.S., Rizzi M., Powell K., kleine Holthaus S.M., Azam S.A., Duran Y., Ribeiro J., Luhmann U.F.O., Bainbridge J.W.B., Smith A.J., Ali R.R.* Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179. Nat. Commun. 6(1): 1–10. 2015.
15. *Peachey N.S., Ray T.A., Florijn R., Rowe L.B., Sjoerdsma T., Contreras-Alcantara S., Baba K., Tosini G., Pozdeyev N., Iuvone P.M., Bojang P.Jr., Pearring J.N., Simonsz H.J., van Genderen M., Birch D.G., Traboulsi E.I., Dorfman A., Lopez I., Ren H., Goldberg A.F.X., Nishina P.M., Lachapelle P., McCall M.A., Koenekoop R.K., Bergen A.A.B., Kamermans M., Gregg R.G.* GPR179 is required for depolarizing bipolar cell function and is mutated in autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. Am. J. Hum. Genet. 90(2): 331–339. 2012.
16. *Chang B.* Survey of the nob5 mutation in C3H substrains. Mol. Vis. 21: 1101–1105. 2015.
17. *Strettoi E.* A survey of retinal remodeling. Front. Cell. Neurosci. 9: 494. 2015.
18. *Truett G.E., Heeger P., Mynatt R.L., Truett A.A., Walker J.A., Warman M.L.* Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). Biotechniques. 29(1): 52–54. 2000.
19. *Bearer E.L., Falzone T.L., Zhang X., Biris O., Rasin A., Jacobs R.E.* Role of neuronal activity and kinesin on tract tracing by manganese-enhanced MRI (MEMRI). Neuroimage. 37: S37–S46. 2007.
20. *Benchorin G., Calton M.A., Beaulieu M.O., Vollrath D.* Assessment of murine retinal function by electroretinography. Bio Protoc. 7(7): e2218. 2017.
21. *Rotov A.Yu., Astakhova L.A., Sitnikova V.S., Evdokimov A.A., Boitsov V.M., Dubina M.V., Ryazantsev M.N., Firsov M.L.* New experimental models of retinal degeneration for screening molecular photochromic ion channel blockers. Acta Naturae. 10(1): 75–84. 2018.
22. *Vinberg F., Kolesnikov A.V., Kefalov V.J.* Ex vivo ERG analysis of photoreceptors using an in vivo ERG system. Vision Res. 101: 108–117. 2014.
23. *Kim K.H., Puoris' haag M., Maguluri G.N., Umino Y., Cusato K., Barlow R.B., de Boer J.F.* Monitoring mouse retinal degeneration with high-resolution spectral-domain optical coherence tomography. J. Vis. 8(1): 1–11. 2008.
24. *Chang B., Hawes N.L., Hurd R.E., Davisson M.T., Nusinowitz S., Heckenlively J.R.* Retinal degeneration mutants in the mouse. Vision Res. 42(4): 517–525. 2002.
25. *Power M., Das S., Schütze K., Marigo V., Ekström P., Paquet-Durand F.* Cellular mechanisms of hereditary photoreceptor degeneration–focus on cGMP. Prog. Retin. Eye Res. 74: 100772. 2020.
26. *Yue L., Weiland J.D., Roska B., Humayun M.S.* Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems. Prog. Retin. Eye Res. 53: 21–47. 2016.
27. *Baker C.K., Flannery J.G.* Innovative optogenetic strategies for vision restoration. Front. Cell. Neurosci. 12: 316. 2018.
28. *Stern J.H., Tian Y., Funderburgh J., Pellegrini G., Zhang K., Goldberg J.L., Ali R.R., Young M., Xie Y., Temple S.* Regenerating eye tissues to preserve and restore vision. Cell Stem Cell. 22(6): 834–849. 2018.
29. *Balmer J., Ji R., Ray T.A., Selber F., Gassmann M., Peachey N.S., Gregg R.G., Enzmann V.* Presence of the Gpr179nob5 allele in a C3H-derived transgenic mouse. Mol. Vis. 19: 2615–2625. 2013.
30. *Wensel T.G.* Signal transducing membrane complexes of photoreceptor outer segments. Vision Res. 48(20): 2052–2061. 2008.
31. *Kutsyr O., Sánchez-Sáez X., Martínez-Gil N., de Juan E., Lax P., Maneu V., Cuenca N.* Gradual Increase in Environmental Light Intensity Induces Oxidative Stress and Inflammation and Accelerates Retinal Neurodegeneration. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 61(10): 1. 2020.
32. *Hoon M., Okawa H., Della Santina L., Wong R.O.* Functional architecture of the retina: development and disease. Prog. Retin. Eye Res. 42: 44–84. 2014.

Age-Related Dynamics of the Retinal Functional State in Mice with Inherited Photoreceptor Degeneration

A. A. Goriachenkov[a], A. Yu. Rotov[a, *], and M. L. Firsov[a]

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

**e-mail: rotovau@gmail.com*

C3H mice with a mutation in the *Pde6b* gene are a standard model object for studying inherited retinal pathologies. These animals lack the function of rod-specific phosphodiesterase, which leads to the photoreceptors' death and complete vision loss by 4 weeks of age.

It was also shown that in C3H mice, originating from Charles River Laboratories – the C3H/Crl strain – there is an additional mutation in the *Gpr179* gene, which leads to disruption of the ON-bipolar retinal cell transduction cascade. Despite the wide distribution of C3H/Crl mice as research objects, a detailed study of their process of photoreceptor degeneration and its features has never been performed yet. Our work aimed to investigate the age-related dynamics of morphological and functional changes occurring in the retinas of C3H/Crl mice in early life. Wild-type mice, the C57Bl/6J strain, were taken as a control group. To assess the functional state of the retina, we used the *in vivo* electroretinography method; morphological analysis was performed on histological preparations of eye tissues. Our study has shown that retinal responses to light stimulation of C3H/Crl mice lack the contribution of rods and ON-bipolar cells during the entire measurement period, starting from the 18th day of life, while cone-derived response disappears by the 25th day. The number of photoreceptors and neurons of the retinal inner nuclear layer in C3H/Crl mice retina is reduced, and by the 25th day of life, photoreceptor degeneration proceeds. At the same time, it was shown that the response amplitude and sensitivity of wild-type mice retina do not undergo significant changes during early life. Our data make it possible to make an insight into the development of retinal pathology in C3H/Crl strain.

Keywords: retina, photoreceptor, ON-bipolar cell, inherited retinal disease, retinitis pigmentosa, electroretinogram

ЦИТИРОВАТЬ:

Горяченков А.А., Ротов А.Ю., Фирсов М.Л. Возрастная динамика функционального состояния сетчатки у мышей с наследственной дегенерацией фоторецепторов. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1496–1511.

DOI: 10.31857/S0869813920120055

TO CITE THIS ARTICLE:

Goriachenkov A.A., Rotov A.Yu., Firsov M.L. Age-Related Dynamics of the Retinal Functional State in Mice with Inherited Photoreceptor Degeneration. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1496–1511.

DOI: 10.31857/S0869813920120055

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1512–1523

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ФЛАВОНОИД КВЕРЦЕТИН УМЕНЬШАЕТ ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И ПОВЫШАЕТ ЭМОЦИОНАЛЬНУЮ РЕАКТИВНОСТЬ У КРЫС

© 2020 г. М. В. Чернышев[1, *], Д. В. Белан[1], О. А. Сапач[1], И. В. Екимова[1]

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

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

Поступила в редакцию 20.05.2020 г.
После доработки 03.08.2020 г.
Принята к публикации 22.09.2020 г.

Работа посвящена исследованию эффектов полифенольного флавоноида кверцетина, обладающего широким спектром фармакологических свойств, на двигательную активность, эмоциональное и тревожно-подобное поведение у крыс в нормальных условиях. Обнаружено, что однократное внутрибрюшинное введение кверцетина в дозе 5 мг/кг вызывает появление отдельных признаков тревожно-подобного поведения в тесте открытое поле (ОП) через 2 ч после инъекции. На это указывало сокращение времени пребывания животного в центральной зоне и увеличение в периферической зоне. Подобный эффект не наблюдался в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Кроме того, в тесте ОП кверцетин вызывал усиление эмоциональной реактивности, о чем свидетельствовало увеличение длительности замираний и числа дефекаций. В этом же тесте наблюдалось заметное снижение уровня горизонтальной двигательной активности: число пройденных секций в центральной и периферической зоне снижалось. Вместе с тем в обоих тестах падал уровень вертикальной двигательной активности, судя по уменьшению числа вертикальных стоек с упором, что является признаком ослабления исследовательского поведения. Полученные факты указывают на анксиогенную направленность действия кверцетина. Изменения в поведении не были сопряжены с изменением содержания стресс-индуцируемого шаперона Hsp70 в структурах головного мозга, вовлеченных в регуляцию двигательного и эмоционального поведения. Высказана гипотеза, что индуцированные кверцетином уменьшение двигательной активности и повышение эмоциональной реактивности у животных связаны с его модулирующим действием на внутриклеточные сигнальные пути киназ, играющих важную роль в нейробиологических процессах.

Ключевые слова: кверцетин, двигательное и эмоциональное поведение, стресс-индуцируемый белок Hsp70, киназы, головной мозг

DOI: 10.31857/S086981392012002X

Кверцетин (3,3',4',5,7-пентагидроксифлавон) является полифенольным флавоноидом, который в большом количестве содержится в различных фруктах и овощах (яблоках, вишнях, капусте, луке, помидорах, ягодах, чае, какао, красном вине и др.) [1–3]. Кверцетин обладает широким спектром биологических активностей:

Список сокращений: HSP70 – белки теплового шока массой 70 кДа, ОП – открытое поле, ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт, ПЗ – периферическая зона, ЦЗ – центральная зона, ЗР – закрытые рукава, ОР – открытые рукава, ТП – тепловое прекондиционирование.

противораковым, антиоксидантным, противовоспалительным, иммуностимулирующим действием [3–5]. Его эффекты также были изучены на различных типах и моделях вирусной инфекции, включая Коронавирус-2 (SARS-CoV-2), в которых кверцетин проявил многообещающее противовирусное действие [6]. Перечисленные защитные эффекты кверцетина связаны с его способностью ингибировать перекисное окисление липидов [7] и активность большого набора киназ [8], влиять на метаболизм арахидоновой кислоты, модулировать сигнальные пути киназ и липидкиназ, а также влиять на функцию тирозиновых протеинов и серин/треонин-киназ [9, 10], таких как фосфатидилинозитол (PI)-3-киназа и индуцибельная синтаза оксида азота (NOS2) [11, 12].

На уровне поведения эффекты кверцетина в наиболее яркой форме проявляются при различных видах стрессорных воздействий. Стоит отметить ряд работ, выявивших антидепрессантный и анксиолитический эффекты кверцетина. Недавно было показано, что хроническое системное введение кверцетина предотвращало развитие тревожно-подобного и депрессивного поведения, а также нарушение пространственной памяти, индуцированное иммобилизационным стрессом, бульбэктомией, хроническим окислительным стрессом у животных [13–15]. Данный эффект авторы связывают с антиоксидантным свойством кверцетина. В другой работе был обнаружен анксиолитический эффект кверцетина при лечении мозговой травмы средней тяжести у мышей [16]. Положительный терапевтический эффект кверцетина показан в модели непредсказуемого стресса, приводившего к широкому спектру поведенческих изменений у крыс: повышение уровня тревожности в сочетании с депрессивно-подобным состоянием, ухудшение кратковременной и долговременной ассоциативной памяти [17]. Следует подчеркнуть определенную особенность представленных исследований – это использование протокола хронического воздействия, где курсовое введение кверцетина применялось для смягчения последствий длительного стрессора, вызывающего, как правило, окислительные процессы в нервной ткани.

Однако, несмотря на широкий круг своего превентивного и терапевтического потенциала, кверцетин обладает и негативным свойством, о чем крайне редко попадаются публикации в литературе. В частности, он способен ингибировать экспрессию стресс-индуцируемых белков теплового шока (Hsp27, Hsp70), влияя на активность транскрипционного фактора HSF2 и в меньшей степени – на HSF1 [18]. Стресс-индуцируемые шапероны являются одной из наиболее консервативных систем защиты клеток и организмов от стресса и различных повреждающих факторов [19]. Они играют ключевую роль в спасении чувствительных к стрессу ферментативных и регуляторных белков. Таким образом, с одной стороны, кверцетин при длительном применении проявляет накопительный эффект и способен стимулировать защитные реакции в организме, влияя на антиоксидантные системы и различные сигнальные пути клетки, но с другой стороны, он способен подавлять важную защитную молекулярную систему на уровне клетки и организма. Так, при изучении гипербарического стресса [20] кверцетин подавлял защитные эффекты индуктора экспрессии Hsp70 геранилгеранилацетона у крыс. В исследованиях *in vitro* показано, что повышенная экспрессия Hsp70 в нейронах гиппокампа предохраняла ЦНС крыс от токсичного воздействия кислорода за счет подавления активности нитроксидсинтазы, уровень которой был значительно повышен в результате воздействия гипербарического кислорода. Указывается, что предварительное оральное вскармливание животных кверцетином препятствовало развитию нейропротективных эффектов Hsp70, а также полностью отменяло выявленный в опытах *in vivo* противосудорожный эффект геранилгеранилацетона [20]. Кроме того, однократное введение кверцетина приводило к снижению уровня Hsp70 в гиппокампе, таламусе и мозолистом теле и оказывало проконвульсантный

эффект в модели NMDA-индуцированных судорог [21]. Дальнейшие исследования этих авторов показали негативный эффект кверцетина на патогенез болезни Паркинсона в модели протеасомной дисфункции нигростриатной системы у крыс [22]. Указывалось, что превентивное введение кверцетина препятствовало лактацистин-индуцированной экспрессии Hsp70 в черной субстанции, ключевой структуре мозга, определяющей главные признаки болезни Паркинсона, и приводило к усилению нейродегенерации в нигростриатной системе мозга, а также к нарушению моторного поведения в модели доклинической стадии болезни Паркинсона.

Таким образом, представленные данные проведенных исследований убедительно свидетельствуют о том, что кверцетин, обладая, несомненно, полезными свойствами, одновременно способен создавать серьезное препятствие для нормального протекания тех биохимических, физиологических и поведенческих процессов, регуляция которых тесным образом связана с экспрессией Hsp70. Кроме того, учитывая его модулирующее влияние на ряд сигнальных киназ, пока остаются неясными его ситуативные эффекты (“здесь и сейчас”) на паттерны эмоционального и двигательного поведения не при патологии. Такие данные в литературе отсутствуют. В настоящей работе была поставлена задача изучить эффекты однократного введения кверцетина на двигательную активность, эмоциональное и тревожно-подобное поведение у крыс в нормальных условиях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на 36 самцах крыс линии Вистар в возрасте 4 мес. и массой тела 220–280 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария Института эволюционной физиологии и биохимии РАН по 5 особей в клетке при температуре окружающей среды 24 ± 1°C с предоставлением воды и корма *ad libitum*. Эксперименты проводили с 14:00 до 19:00 ч. Манипуляции с животными осуществляли в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных Института эволюционной физиологии и биохимии РАН, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Введение кверцетина. Биофлаваноид кверцетин (ICN, США) вводили животным внутрибрюшинно (в/б) в дозе 5 мг/кг. Препарат растворяли в 20 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и доводили до объема 0.2 мл физиологическим раствором (0.9%-ным раствором NaCl). Контрольным крысам делали в/б инъекцию 0.2 мл физиологического раствора с добавлением 20 мкл DMSO.

Поведенческие тесты. В первой серии экспериментов оценивалось влияние кверцетина на показатели исследовательской и двигательной активности, а также эмоционального поведения и тревожности. Учитывая, что при внутривенном введении период полувыведения кверцетина составляет 0.7–2.4 ч [23], поведенческие тесты у крыс проводили через 2 ч после введения препарата (n = 17) или его растворителя (n = 19). Каждый из тестов по оценке поведения проводился в отдельный день. Крыс за 12 ч до тестирования переносили в помещение, где располагалась соответствующая установка. После тестирования каждого животного установки дезодорировали 3%-ным раствором перекиси водорода. Видеорегистрация тестов с последующей обработкой паттернов поведения осуществлялась с помощью компьютерной программы RealTimer 1.21 (НПК Открытая Наука, Москва).

Открытое поле (ОП). Тест использовался для оценки двигательной активности, исследовательского поведения, эмоциональной реактивности, а также тревожности [24]. Установка ОП представляла собой пластиковую конструкцию, состоящую из круглой арены диаметром 97 см, ограниченной по периметру стенкой высотой 42 см. Область арены была поделена на 12 секций периферической (преферентной) зоны (ПЗ) и 7 секций центральной (аверсивной) зоны (ЦЗ). Ширина ЦЗ – 30 см,

ширина ПЗ – 20 см. Тест начинался с помещения животного в центр арены, после чего производилась 5-минутная видеосъемка. Регистрировались количественные и временные характеристики стандартных паттернов активности животного в разных зонах ОП: горизонтальная двигательная активность (секции, пройденные в ПЗ и ЦЗ, а также их сумма), вертикальная двигательная активность (вертикальные стойки с упором), исследовательская активность (вертикальные стойки с упором и отношение секций, пройденных в ЦЗ к ПЗ), эмоциональная реактивность (вертикальные стойки без упора, замирания, груминг, дефекации и уринации), тревожность (отношение времени пребывания в ЦЗ к ПЗ).

Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Тест использовался для оценки тревожности, эмоциональной реактивности, а также двигательной и исследовательской активностей [25]. Установка ПКЛ представляла собой крестообразную пластиковую конструкцию, приподнятую на высоту 50 см от пола. Лабиринт состоял из 2 закрытых (преферентных) рукавов (ЗР) и 2 открытых (аверсивных) рукавов (ОР). Длина каждого из рукавов составляла 50 см с высотой бортов для ЗР 40 см. Тест начинался с помещения животного в центр пересечения четырех рукавов, после чего производилась 10-минутная видеосъемка. Регистрировались количественные и временные характеристики стандартных паттернов активности животного в разных рукавах ПКЛ. Оценивались следующие домены поведения: тревожность (входы в ОР и их отношение ко всем входам), а также горизонтальная двигательная активность (входы в ЗР), вертикальная двигательная активность (вертикальные стойки с упором), эмоциональная реактивность (груминг и дефекации).

Вестерн-блоттинг. Учитывая, что кверцетин является ингибитором экспрессии стресс-индуцируемого белка Hsp70, мы во второй серии экспериментов с помощью Вестерн-блоттинга исследовали содержание Hsp70 в вентральном стриатуме, амигдале, голубом пятне, черной субстанции и прилегающей к ней вентральной тегментальной области (ЧС/ВТО) среднего мозга, вовлеченных в механизмы регуляции двигательной активности, эмоционального и тревожно-подобного поведения [26, 27]. Для этой цели крыс декапитировали через 2 ч после внутрибрюшинного введения кверцетина ($n = 5$) или контрольного раствора ($n = 6$), а затем извлекали головной мозг. Мозг помещали на холодную подложку и согласно атласу Paxinos и Watson [28] выделяли указанные выше структуры головного мозга. Образцы тканей головного мозга лизировали с использованием High RIPA-буфера и гомогенизировали металлической палочкой. Лизаты центрифугировали (13000 об/мин, 10 мин), концентрацию суммарного белка в супернатантах измеряли по методу Bradford [29], белки осаждали ацетоном. Осадок растворяли в однократном буфере для нанесения проб (SDS – 2%, Tris HCl pH 6.8–62.5 мМ, глицерол – 10%, бромфеноловый синий, β-меркаптоэтанол – 10%) и инкубировали при температуре 99°C в течение 5 мин. В лунки полиакриламидного геля наносили пробы, содержащие одинаковое количество белка, и разделяли с помощью электрофореза по Laemmli [30] в течение 100 мин при постоянном токе 30 мА. После электрофореза белки из геля переносили на PVDF-мембрану Immobilon-P с размером пор 0.45 мкм (Millipore Corporation, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител мембраны инкубировали в фосфатном буфере с добавлением 0.1% Tween-20 и 3% бычьего сывороточного альбумина в течение 1 ч при комнатной температуре. Иммуномечение проводили с использованием первичных моноклональных антител мыши к индуцируемому Hsp70 (клон 3C5, любезно предоставлен г. н. с. лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН Б.А. Маргулисом) или GAPDH (1 : 1000; Abcam, Великобритания) и вторичных антител осла к мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (1 : 10000; Abcam, Великобритания). Визуализацию пероксидазной реакции проводили с помощью метода усиленной хемилюминесценции в темной комнате с использованием рентгеновской пленки.

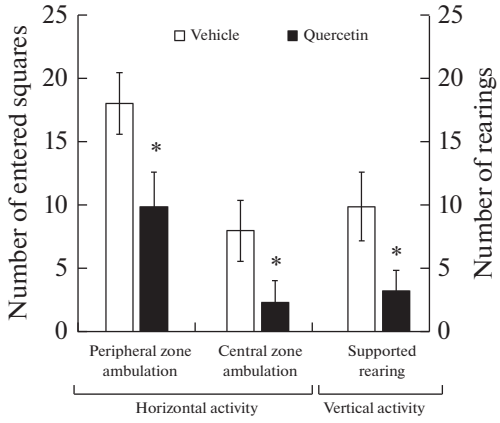


Рис. 1. Влияние кверцетина на локомоторное поведение крыс в тесте ОП через 2 ч после его введения. По оси абсцисс: Horizontal activity (peripheral zone ambulation – перемещение в переферической зоне, central zone ambulation – перемещение в центральной зоне; Vertical activity (supported rearing – вертикальные стойки с упором. По оси ординат: Number of entered squares – число пройденных секций. * $p \leq 0.05$.

Fig. 1. Alterations in locomotor behavior in the open field test in rats 2 h after a single intraperitoneal administration of quercetin. The significance of differences in experimental group (quercetin) relative to control group (vehicle) * $p < 0.05$.

Денситометрический анализ количества белка был осуществлен с помощью программы ImageJ. Уровень серого бендов Hsp70 был скорректирован по фоновому сигналу и нормирован на сигнал GAPDH, выявляемый для определения общего количества белка в пробах.

Статистический анализ данных, полученных в двух независимых группах сравнения (контрольной и экспериментальной), проводили с помощью программы Statistica 7.1. Для выявления различий между группами использовался параметрический *t*-критерий Стьюдента, поскольку полученные данные имели нормальное распределение по тесту Колмогорова–Смирнова. Полученные результаты считались статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ поведения животных в тестах ОП и ПКЛ выявил ряд статистически значимых различий между экспериментальной группой, получавшей в/б инъекцию кверцетина, и контрольной. На рис. 1 представлены данные, показывающие эффект действия кверцетина на показатели двигательной активности в тесте ОП. Выяснено, что кверцетин уменьшает число секций, пройденных в ПЗ в 1.8 раза ($p < 0.05$) и ЦЗ в 3.3 раза ($p < 0.05$), что указывает на снижение уровня горизонтальной двигательной активности в экспериментальной группе по сравнению с контрольной. Одновременно с этим отмечалось снижение вертикальной двигательной активности, выражавшейся в уменьшении числа вертикальных стоек с упором в тесте ОП в 3.3 раза ($p < 0.05$), что вместе с предыдущими данными может указывать на снижение уровня исследовательской активности.

Уменьшение числа вертикальных стоек с упором наблюдалось и в тесте ПКЛ в 3.4 раза ($p < 0.05$) (табл. 2). Важно отметить, что в тесте ОП у экспериментальных животных наблюдалось смещение временного баланса пребывания в исследуемых зонах (табл.1) – время в ПЗ увеличивалось в 1.1 раза ($p < 0.01$), а время в ЦЗ умень-

Таблица 1. Влияние кверцетина на показатели эмоционального и тревожно-подобного поведения у крыс в тесте ОП
Table 1. Effects of quercetin on parameters of emotional and anxiety-like behavior in the open field test

Параметры поведения/Направленность эффекта Parameters/Trend	Контрольная группа Control group	Экспериментальная группа Experimental group
Время пребывания в ПЗ, с/+ Time spent in the PZ, s /+	**279.3 ± 4.5**	**295.6 ± 2.9 ****
Время пребывания в ЦЗ, с /– Time spent in the CZ, s/–	**20.7 ± 4.5**	**4.4 ± 2.9 ****
Время замираний, с/+ Time of freezing, s/+	**45.4 ± 14**	**108 ± 26 ***
Число актов замираний/+ Number of freezings/+	1.9 ± 0.6	2.8 ± 0.4
Время груминга, с/0 Time of grooming, s/0	7.7 ± 2.6	10.8 ± 2.8
Число актов груминга/0 Number of groomings/0	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.2
Число дефекаций/+ Number of fecal boli/+	**0.7 ± 0.4**	**2.4 ± 1***

ПЗ – периферическая зона; ЦЗ – центральная зона. + увеличение, – уменьшение, 0 – отсутствие значимых изменений. $M \pm$ SEM, достоверность различий в экспериментальной группе относительно контрольной * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.
PZ – peripheral zone, CZ – central zone. + increased, – decreased, 0 – no changes. $M \pm$ SEM, the significance of differences in experimental group relative to control group * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

шалось в 5 раз ($p < 0.01$), что является базовым признаком усиления тревожности. Кроме этого, в тесте ОП (табл. 1) у животных экспериментальной группы было обнаружено увеличение времени замираний в 2.4 раза ($p < 0.05$) и возрастание числа болюсов дефекации в 3.4 раза ($p < 0.05$), что может указывать на повышенный уровень эмоциональной реактивности и тревожности. Эффекта действия кверцетина на другие исследуемые показатели (в тесте ОП: число актов замираний; в тестах ОП и ПКЛ: число и время актов груминга; в тесте ПКЛ: число входов и время пребывания в ЗР, число входов и время пребывания в ОР, отношение числа входов в ОР к общему числу входов, число заглядываний в ОР, число свешиваний с ОР) выявлено не было (табл. 1 и 2).

Выявленные нами изменения в двигательной активности и эмоциональном поведении после введения кверцетина не сопровождались изменением уровня Hsp70 в вентральном стриатуме, амигдале, голубом пятне и ЧС/ВТО по сравнению с контролем (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование является продолжением ранее проведенной серии экспериментов, нацеленной на изучение роли шаперона Hsp70 в молекулярных механизмах регуляции различных форм поведения [31]. Эти эксперименты показали, что тепловое прекондиционирование (ТП), повышающее экспрессию стресс-индуцируемого белка Hsp70 в головном мозге, приводит к снижению уровня тревожности в тесте ПКЛ у крыс. Отмечалось увеличение числа и времени входов в ОР, а также процентного отношения числа входов в ОР к общему числу всех входов. В настоящей работе, где применялся ингибитор экспрессии Hsp70 кверцетин, поз-

Таблица 2. Влияние кверцетина на показатели двигательного, эмоционального и тревожно-подобного поведения у крыс в тесте ПКЛ
Table 2. Effects of quercetin on locomotor, emotional and anxiety-like behavior in the elevated plus maze test

Параметры поведения/Направленность эффекта Parameters/Trend	Контрольная группа Control group	Экспериментальная группа Experimental group
Число входов в ЗР/0 Number of entries in the CA/0	2.7 ± 0.52	2.22 ± 0.64
Время пребывания в ЗР, с/0 Time spent in the CA, s/0	272.8 ± 7.47	278 ± 5.2
Число входов в ОР/0 Number of entries in the OA/0	2.4 ± 0.45	2.11 ± 0.68
Время пребывания в ОР, с/0 Time spent in the CA s/0	24.9 ± 7.58	15.44 ± 5.26
Отношение числа входов в ОР, %/0 Percentage of entries in the CA, %/0	47 ± 8.88	49 ± 15.8
Число заглядываний в ОР/0 Number of protected head dips in the OA /0	4.4 ± 1	4 ± 1.37
Число свешиваний с ОР/0 Number of unprotected head dips in the OA /0	2.6 ± 0.78	2.11 ± 0.79
Число актов груминга /0 Number of groomings/0	0.8 ± 0.47	0.56 ± 0.38
Время груминга, с/0 Time of grooming, s/0	13.8 ± 8.78	13.67 ± 9.5
Число вертикальных стоек с упором/– Number of supported rearings/–	**9.7 ± 1.51**	**2.89 ± 0.86****
Число дефекаций Number of fecal boli/0	2.1 ± 0.8	1.7 ± 0.7

ОР – открытые рукава; ЗР – закрытые рукава. + увеличение, – уменьшение, 0 – отсутствие значимых изменений. $M \pm$ SEM, достоверность различий в экспериментальной группе относительно контрольной * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.
CA – closed arms, OA – open arms. + increased, – decreased, 0 – no changes. $M \pm$ SEM, the significance of differences in experimental group relative to control group * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

воляющий ожидать противоположный результат, в том же тесте не удалось выявить влияние кверцетина на тревожно-подобное поведение крыс. Однако в тесте ОП наблюдалось отчетливое уменьшение времени пребывания в ЦЗ (параметр, аналогичный времени входов в ОР для ПКЛ) на фоне его увеличения в ПЗ, что является наиболее индикативным свидетельством повышения уровня тревожности в этом тесте [32, 33].

Более того, на усиление тревожности крыс в этом тесте может также указывать и выявленное увеличение числа замираний, одного из этологических паттернов поведения, показывающих высокую чувствительность к изменениям уровня тревожности и эмоциональной реактивности [24, 32, 33]. Сюда же следует отнести и обнаруженное увеличение числа болюсов дефекаций. Хотя этот показатель традиционно относят к индексу эмоциональности, однако, рост числа болюсов, как правило, коррелирует с ростом тревожности животного. Таким образом, выявленный в работе анксиогенный профиль сопровождался повышенной эмоциональной реактивностью. Следует отметить, что в исследовании с использованием ТП по этим последним показателям не было обнаружено изменений. Можно заключить, что в двух сравниваемых исследованиях профиль эффектов в тревожно-подобном поведении был несколько различным и показывал противоположный результат: применение ТП характеризовалось анксиолитическим эффектом, а введение кверцетина, напротив, вызывало анксиогенный эффект.

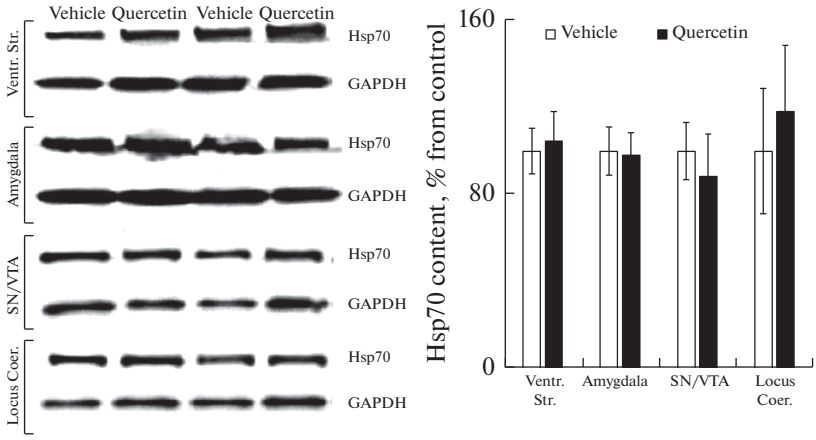


Рис. 2. Содержание Hsp70 в вентральном стриатуме (Ventr. Str.), амигдале (Amygdala), черной субстанции, вентральной тегментальной области (SN/VTA) и голубом пятне (Locus Coer.) крыс в контроле (Vehicle) и через 2 ч после однократного внутрибрюшинного введения кверцетина (Quercetin). Слева представлены иммуноблоты. На графике по вертикали – оптическая плотность Hsp70, % от контроля.

Fig. 2. Hsp70 content in ventral striatum (Ventr. Str.), Amygdala (Amygdala), substantia nigra, ventral tegmental area (SN/VTA) and locus coeruleus (Locus Coer.) of rats 2 h after a single intraperitoneal administration of quercetin. The left part of the figure shows immunoblots.

Кроме того, в настоящем исследовании обнаружено выраженное снижение общей двигательной активности крыс под действием кверцетина, что также контрастирует с сопоставляемыми данными предыдущей работы, в которой было показано увеличение числа входов в ЗР лабиринта после воздействия ТП. Несмотря на то, что именно по этому показателю нам не удалось выявить значимых различий между группами при анализе эффектов кверцетина в ПКЛ, негативное влияние на горизонтальную двигательную активность довольно убедительно проявилось в тесте ОП: отмечалось существенное уменьшение числа секций, пройденных во всех зонах арены, т.е. в ПЗ и ЦЗ (рис. 1). Более того, наблюдалось экстенсивное падение уровня вертикальной двигательной активности, судя по уменьшению числа вертикальных стоек с упором как в тесте ОП (рис. 1), так и в ПКЛ (табл. 2). Этот показатель в совокупности с предыдущими параметрами поведения в значительной мере может отображать уровень исследовательской активности [34, 35], а полученный результат в виде ее снижения является противоположным по отношению к результату действия ТП в ПКЛ.

Следует отметить, что исследовательское поведение тоже имеет взаимосвязь с тревожностью. Существует достаточно обоснованная гипотеза о том, что реализация исследовательской активности является результатом инактивации поведенческого ингибирования, обусловленного фактором тревожности [36]. Иначе говоря, наблюдается обратно пропорциональная зависимость – чем ниже уровень тревожности, тем выше уровень исследовательской активности, и наоборот. Полученные в работе результаты указывают на смещение кверцетином баланса данной системы в негативную сторону или комплексного анксиогенного профиля.

Однако уменьшение двигательной активности и повышение эмоциональной реактивности при введении кверцетина животным не дает серьезного основания объяснять наблюдаемые эффекты с позиции только ингибирующего действия кверцетина на экспрессию шаперонов. В наших опытах мы не наблюдали умень-

шения содержания Hsp70 в структурах головного мозга, участвующих в регуляции тревожно-подобного и двигательного поведения. Это может быть связано с тем, что снижение количества Hsp70 происходит достаточно постепенно, и 2 ч после ингибирования фактора транскрипции шаперонов HSF является слишком коротким периодом, чтобы увидеть какие-либо изменения с помощью Вестерн-блоттинга. Мы полагаем, что в изменение эмоционального и двигательного поведения в этот период может вносить вклад в способность кверцетина влиять на внутриклеточные сигнальные пути киназ, играющих важную роль в нейробиологических процессах. Кверцетин проявляет ингибирующую активность на ферменты фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), протенкиназу Б (Akt), тирозинкиназу, MAP-киназу и др. [8]. Ингибирующее или стимулирующее действие на этих путях могут оказать влияние на клеточные функции, пролифирацию и гибель клеток, нейротрансмиссию, формирование синаптической пластичности [8, 37]. Показано, что сигнальный каскад PI3K–AKT–GSK3β–CREB играет важную роль в модуляции тревожно-подобного поведения [38], а дисрегуляция GSK-3β пути приводит к развитию депрессивно- и маниакально-подобного поведения [39, 40].

Сопоставляя полученные нами данные с работами других авторов, следует, прежде всего, обратить внимание на некоторые отличительные особенности, характерные для результатов работ, связанных с изучением влияния кверцетина на поведение животных в моделях стресс-индуцируемой тревожности [13], мозговой травмы [16] и непредсказуемого стресса [17] у животных. Их общей чертой является выраженный анксиолитический эффект кверцетина при его многократном применении в течение 14–21 дней. Это указывает на то, что реализация анксиолитического эффекта кверцетина достигается за счет “накопительного” длительного действия, а не ситуативного. В наших опытах оценивалось ситуативное действие кверцетина “здесь и сейчас” – через 2 ч после применения препарата в нормальных условиях (не при патологии). В этом случае кверцетин оказывал анксиогенный эффект с ослаблением двигательной активности.

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что кверцетин, обладающий широким спектром биологической активности, способен оказывать влияние на отдельные формы поведения животных. Выявленный в работе отчетливый негативный эффект на двигательную активность является немаловажным основанием для пересмотра профиля назначения его в качестве терапевтического препарата, широко используемого в современной фармацевтике и аптечном секторе (таксифолин, дигидрокверцетин и другие его изоформы). Более того, обнаруженное подавление исследовательского поведения и усиление эмоциональной реактивности с появлением отдельных признаков тревожности при однократном введении кверцетина также подчеркивают значимость учета фармакологических свойств этого препарата.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке госзадания (тема № АААА-А18-118012290427-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Anand David A.V., Arulmoli R., Parasuraman S.* Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. Pharmacogn. Rev. 10: 84–89. 2016.

2. *Almeida A.F., Borge G.I.A., Piskula M., Tudose A., Tudoreanu L., Valentova K., Williamson G., Santos C.N.* Bioavailability of Quercetin in Humans with a Focus on Interindividual Variation. Compar. Rev. Food Sci. Food Saf. 17: 714–731. 2018.
3. *Boots A.W., Haenen R., Bast A.* Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. Eur. J. Pharmacol. 585: 325–337. 2008. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008
4. *Brito A.F., Ribeiro M., Abrantes A.M., Pires A.S., Teixo R.J., Tralhão J.G., Botelho M.F.* Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional therapeutics? Curr. Med. Chem. 22: 3025–3039. 2015. https://doi.org/10.2174/0929867322666150812145435
5. *Qin M., Chen W., Cui J., Li W., Liu D., Zhang W.* Protective efficacy of inhaled quercetin for radiation pneumonitis. Exp. Ther. Med. 14(6): 5773–5778. 2017. https://doi.org/10.3892/etm.2017.5290
6. *Colunga Biancatelli R.M.L., Berrill M., Catravas J.D., Marik P.E.* Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). Front. Immunol. 11: 1451. 2020. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01451
7. *Cai Q., Rahn R.O., Zhang R.* Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. Cancer Lett. 119(1): 99–107. 1997. https://doi.org/10.1016/s0304-3835(97)00261-9
8. *Boly R., Gras T., Lamkami T., Guissou P, Serteyn D., Kiss R., Dubois J.* Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. Int. J. Oncol. 38(3): 833–842. 2011. https://doi.org/10.3892/ijo.2010.890
9. *Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P.* Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem. J. 351(Pt. 1): 95–105. 2000. https://doi.org/10.1042/bj3510095
10. *Huang Y.T., Hwang J.J., Lee P.P.* Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. Br. J. Pharmacol. 128(5): 999–1010. 1999. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702879
11. *Agullo G., Gamet-Payrastre L., Manenti S., Viala C., Rémésy C., Chap H.* Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. Biochem. Pharmacol. 53(11): 1649–1657. 1997. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)82453-7
12. *Peet G.W., Li J.* IkappaB kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. J. Biol. Chem. 274(46): 32655–32661. 1999. https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32655
13. *Samad N., Saleem A., Yasmin F., Shehzad M.A.* Quercetin protects against stress-induced anxiety- and depression-like behavior and improves memory in male mice. Physiol. Res. 67(5): 795–808. 2018.
14. *Holzmann I., da Silva L.M., Corrêa da Silva J.A., Steimbach V.M., de Souza M.M.* Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitrergic pathways. Pharmacol. Biochem. Behav. 136: 55–63. 2015. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.07.003
15. *Khan K., Najmi A.K., Akhtar M.A.* Natural Phenolic Compound Quercetin Showed the Usefulness by Targeting Inflammatory, Oxidative Stress Markers and Augment 5-HT Levels in One of the Animal Models of Depression in Mice. Drug Res. (Stuttg). 69(7): 392–400. 2019. https://doi.org/10.1055/a-0748-5518
16. *Kosari-Nasab M., Shokouhi G., Ghorbanihaghjo A., Mesgari-Abbasi M., Salari A.A.* Quercetin mitigates anxiety-like behavior and normalizes hypothalamus-pituitary-adrenal axis function in a mouse model of mild traumatic brain injury. Behav. Pharmacol. 30(2): 282–289. 2019. https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000480
17. *Mehta V., Parashar A., Udayabanu M.* Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. Physiol. Behav. 171: 69–78. 2017. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.006
18. *Hosokawa N., Hirayoshi K., Nakai A., Hosokawa Y., Marui N., Yoshida M., Sakai T., Nishino H., Aoike A., Kawai K.* Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. Cell Struct. Funct. 15(6): 393–401. 1990.
19. *Hartl F.U.* Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature. 381: 571–579. 1996.
20. *Yi H., Huang G., Zhang K., Liu S., Xu W.* HSP70 protects rats and hippocampal neurons from central nervous system oxygen toxicity by suppression of NO production and NF-κB activation. Exp. Biol. Med. (Maywood). 243(9): 770–779. 2018. https://doi.org/10.1177/1535370218773982

21. *Ницинская Л.Е., Екимова И.В., Гужова И.В., Фейзулаев Б.А., Пастухов Ю.Ф.* Влияние кверцетина на тяжесть химически индуцированных судорог и содержание белка теплового шока 70 Кда в структурах головного мозга крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 96(3): 283–292. 2010. [*Nitsinskaya L.E., Ekimova I.V., Guzhova I.V., Feizulaev B.A., Pastukhov Y.F.* Effect of quercetin on the severity of chemically induced seizures and thecontentofheatshockprotein70intheratbrainstructures. Russ. J. Physiol. 96(3): 283-292. 2010. (In Russ)].
22. *Екимова И.В., Плаксина Д.В.* Влияние кверцетина на нейродегенеративные и компенсаторные процессы в нигростриатной системе в модели преклинической стадии болезни Паркинсона у крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 102(6): 647–658. 2016. [*Ekimova I.V., Plaksina D.V.* Effect of quercetin on neurodegenerative and compensatory processes in nigrostriatal system in a model of preclinical parkinson's disease stage in rats. Russ. J. Physiol. 102(6): 647–658. 2016. (In Russ)].
23. *Graefe E.U., Derendorf H., Veit M.* Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 37(5): 219–233. 1999.
24. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М. Высш. школа. 1991. [*Bures J., Buresova O., Huston J.* Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. New York. Elsevier Science Publ. 1983 (*Bures J., Buresova O., Huston J.* Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. Moscow. Vyschaya shkola. 1991. (In Russ)].
25. *Walf A.A., Frye C.A.* The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat. Protoc. 2(2): 322–328. 2007.
26. *Cardinal R.N., Hall J., Everitt B.J., Parkinson J.A.* The contribution of the amygdala, nucleus accumbens, and prefrontal cortex to emotion and motivated behaviour. Int. Congr. Ser. 1250: 347–370. 2003.
27. *McCall J.G., Siuda E.R., Bhatti D.L., Lawson L.A., McElligott Z.A., Stuber G.D., Bruchas M.R.* Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. Elife. 6: e18247. 2017.
https://doi.org/10.7554/eLife.18247
28. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Acad. Press. 2006.
29. *Bradford M.M.* A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72(1): 248–254. 1976.
30. *Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K.* Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252(3): 1102–1106. 1997.
31. *Чернышев М.В., Сапач О.А.* Тепловое прекондиционирование снижает уровень тревожности у крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(5): 556–564. 2019. [*Chernyshev M.V., Sapach O.A.* Thermal preconditioning decreases a level of anxiety in rats. Russ. J. Physiol. 105(5): 556–564. 2019. (In Russ)].
32. *Carola V., D'Olimpio F., Brunamonti E., Mangia F., Renzi P.* Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. Behav. Brain Res. 134(1–2): 49–57. 2002.
33. *Kalueff A.V.* Experimental modeling in anxiety and depression research. Psychopharmacol. Biol. Narcol. 4(2–3): 663–670. 2004.
34. *Петров Е.С.* Изучение нейробиологических основ сложных безусловных рефлексов в Физиологическом отделе им. И.П. Павлова: итоги последних лет. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 84(121): 1669–1681. 1990. [*Petrov E.S.* A study of neurobiological basis of complex unconditioned reflexes in I.P. Pavlov Physiological department: resumes of the last years. Russ. J. Physiol. 84(121): 1669–81. 1990. (In Russ)].
35. *Sturman O., Germain P.L., Bohacek J.* Exploratory rearing: a context- andstress-sensitive behavior recorded in the open-field test. Stress. 21(5): 443–452. 2018.
https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405
36. *Montgomery K.C.* The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. J. Compar. Physiol. Psychol. 48: 254–60. 1955.
37. *Duman R.S., Voleti B.* Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. Trends Neurosci. 35(1): 47–56. 2012.
https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.004
38. *Qiao X., Gai H., Su R.* PI3K-AKT-GSK3β-CREB signaling pathway regulates anxiety-like behavior in rats following alcohol withdrawal. J. Affect. Disord. 235: 96–104. 2018.
https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.04.039
39. *Polter A., Beurel E., Yang S.* Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. Neuropsychopharmacology. 35(8): 1761–1774. 2010.
https://doi.org/10.1038/npp.2010.43
40. *Diniz B.S., Talib L.L., Joaquim H.P., de Paula V.R., Gattaz W.F., Forlenza O.V.* Platelet GSK3B activity in patients with late-life depression: marker of depressive episode severity and cognitive impairment? World J. Biol. Psychiatry. 12(3): 216–222. 2011.
https://doi.org/10.3109/15622975.2010.551408

Flavonoid Quercetin Attenuates Locomotor Attivity and Enhances Emotional Reactivity in Rats

M. V. Chernyshev[a], *, D. V. Belan[a], O. A. Sapach[a], and I. V. Ekimova[a]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg, Russia*
**e-mail: netmisha@mail.ru*

This work is aimed at the investigation of the effects of polyphenolic flavonoid quercetin, possessing a wide range of pharmacological properties, on locomotor, emotional and anxiety-like behavior in rats under normal conditions. Intraperitoneal administration of quercetin at a dose of 5 mg/kg was found to induce several types of anxiety-like behavior in the open field (OF) test 2 hours after the injection. It was characterized by reduced time spent in the central zone of the arena, and increased — in the peripheral zone. Such effects were absent in the elevated plus maze (EPM) test. Additionally, quercetin induced an enhanced emotional reactivity in the OF test that manifested in a prolonged freezing duration and the increased number of fecal boli. A considerable decrease in the level of horizontal activity was detected in this test: the number of squares crossed in the peripheral and the central zones was decreased. Moreover, the number of supported rearings was decreased in both tests, which reflects an attenuation of the exploratory behavior. These findings indicate the anxiogenic action of quercetin. Elicited behavioral changes induced by quercetin were not linked to changes in the stress-induced protein Hsp70 content in the brain structures implicated in locomotion and emotion regulation. We propose that the decreased locomotor activity and increased emotional reactivity following quercetin administration in rats are associated with its modulatory effects on the intracellular kinase signaling pathways that play an important role in the neurobiological processes.

Keywords: quercetin, locomotory and emotional behavior, stress-induced protein Hsp70, kinase, brain

ЦИТИРОВАТЬ:

Чернышев М.В., Белан Д.В., Сапач О.А., Екимова И.В. Флавоноид кверцетин уменьшает двигательную активность и повышает эмоциональную реактивность у крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1512–1523.

DOI: 10.31857/S086981392012002X

TO CITE THIS ARTICLE:

Chernyshev M.V., Belan D.V., Sapach O.A. and Ekimova I.V. Flavonoid Quercetin Attenuates Locomotor Attivity and Enhances Emotional Reactivity in Rats. Russian Journal of Physiology. 106(12): 1512–1523.

DOI: 10.31857/S086981392012002X

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1524–1540

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЭФФЕКТЫ СТИМУЛЯЦИИ ИНФРАЛИМБИЧЕСКОЙ КОРЫ НА РЕАКЦИИ НЕЙРОНОВ КАУДАЛЬНОЙ ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОЙ РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ НОЦИЦЕПТИВНЫМ РАЗДРАЖЕНИЕМ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ

© 2020 г.
С. С. Пантелеев[1, *], И. Б. Сиваченко[1], И. И. Бусыгина[1], О. А Любашина[1, 2]

[1]*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[2]*Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: panteleev0@gmail.com*

Поступила в редакцию 17.09.2020 г.
После доработки 15.10.2020 г.
Принята к публикации 16.10.2020 г.

Инфралимбическая кора больших полушарий головного мозга характеризуется обширной системой афферентных и эфферентных связей с кортикальными, субкортикальными, стволовыми структурами и спинным мозгом, обеспечивающими ее участие в высших механизмах регуляции функций висцеральной сферы. Вместе с тем, участие инфралимбической коры в нейрональных механизмах модуляции висцеральной ноцицепции как острой, так и хронической представляется недостаточно ясным. В работе с использованием модели абдоминальной боли на двух группах наркотизированных уретаном крыс (нормальные крысы и крысы с экспериментальным колитом) изучались эффекты электрической стимуляции инфралимбической коры на реакции нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга и изменения артериального давления, вызванные ноцицептивным растяжением колоректальной области толстой кишки. Установлено, что у крыс обеих групп ноцицептивное колоректальное растяжение сопровождается как возбудительными, так и тормозными реакциями нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации, а также депрессорными изменениями артериального давления. Впервые показано, что электрическая стимуляция инфралимбической коры усиливает возбудительные и уменьшает тормозные реакции нейронов на висцеральное болевое раздражение, а также усиливает депрессорные реакции как у нормальных крыс, так и у крыс с колитом. Этот эффект был более выражен в группе нормальных животных. В целом влияние инфралимбической коры на ноцицептивные нейроны вентролатеральной ретикулярной формации и васкулярные реакции на висцеральную боль можно рассматривать как облегчающие висцеральную ноцицепцию. Количественные различия в эффектах кортикальной стимуляции у нормальных крыс и крыс с колитом, возможно, связаны с различиями в обработке мозгом острой висцеральной боли и боли, осложненной хроническим воспалением. Одним из возможных механизмов кортикального влияния на висцеральную ноцицепцию может быть модуляция текущей активности ноцицептивных нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации, прямо или косвенно участвующих в нисходящем контроле висцеральной боли.

Ключевые слова: инфралимбическая кора, каудальная вентролатеральная ретикулярная формация, висцеральная ноцицепция, нейрональная активность, толстая кишка, колит

DOI: 10.31857/S0869813920120067

Известно, что некоторые области коры больших полушарий головного мозга имеют прямое отношение к высшим механизмам регуляции функций висцеральной сферы [1]. В частности, это относится к расположенной на медиальной поверхности ростральной части больших полушарий головного мозга медиальной префронтальной коре. В дорсо-вентральном направлении медиальная префронтальная кора крысы подразделяется на переднюю поясную (ACC), прелимбическую (PLC) и инфралимбическую кору (ILC) [2, 3], последнюю принято рассматривать в качестве "висцеромоторного" поля коры больших полушарий головного мозга, так как электрическое или химическое раздражение этой кортикальной области сопровождается значительными изменениями артериального давления крови, частоты сердечных сокращений, дыхательной функции, а также моторной и секреторной деятельности желудочно-кишечного тракта [4–8]. Инфралимбическая кора характеризуется обширной системой афферентных и эфферентных связей с кортикальными, субкортикальными, стволовыми структурами и спинным мозгом, обеспечивающими ее участие в широком спектре процессов, связанных с памятью, когнитивной деятельностью, эмоциональным и аффективным поведением и т.п. [9–17]. Анализ этих функций инфралимбической коры не входит в задачи настоящей работы, поэтому мы остановимся на ее связях и функциях, имеющих отношение к основной цели настоящей работы, а именно, к изучению нейрональных механизмов кортикальной модуляции висцеральной ноцицепции. Предполагается, что кортикальная модуляция висцеральной ноцицепции реализуется через прямые проекции инфралимбической коры к структурам мозга, входящим в состав так называемой эндогенной системы нисходящей модуляции боли [18–22], конечным звеном которой являются афферентные нейроны дорсального рога спинного мозга, формирующие восходящий поток висцероцептивной, в том числе и ноцицептивной информации в супраспинальные структуры мозга, включая кору больших полушарий. Одной из ключевых структур в этой системе является каудальная вентролатеральная ретикулярная формация продолговатого мозга [23], нейроны которой имеют прямые реципрокные связи с нейронами люмбо-сакрального отдела спинного мозга [24], где оканчиваются афферентные волокна тазового нерва от органов брюшной полости, в частности, от толстого кишечника. Электрическая или химическая стимуляция этой области продолговатого мозга сопровождается висцеромоторными и поведенческими реакциями на висцеральную боль у крыс [25]. В этой области продолговатого мозга обнаружены группы нейронов, отвечающих специфическим паттерном активности на ноцицептивное колоректальное растяжение [26], реакции которых существенно изменялись на фоне действия антиноцицептивных субстанций [27–30], а также в условиях кишечного воспаления [31, 32]. В отличие от стволовых механизмов модуляции боли [25], механизмы кортикальной модуляции висцеральной ноцицепции как острой, так и хронической остаются малоизученными. Поэтому основной целью данного исследования было оценить эффекты электрической стимуляции инфралимбической коры головного мозга крыс на реакции висцеральных ноцицептивных нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации и на изменения артериального давления, вызванные ноцицептивным колоректальным растяжением у нормальных крыс и у крыс с экспериментальным колитом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 22-х наркотизированных уретаном (1.5 мг/кг, внутрибрюшинно; ICN Biomedical Inc., США) самцах крыс линии Вистар массой 250–300 г, выведенных и содержавшихся в стандартных условиях вивария Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Коллекция лабораторных млекопитающих разной

таксономической принадлежности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН). Все эксперименты выполнены в соответствии с этическими принципами Международной ассоциации по изучению боли и Директивой Совета Европейского сообщества (86/609/EEC), а также требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (заключение №02/24 от 24 февраля 2020 г.). Для изучения эффектов электрической стимуляции инфралимбической коры на висцеральную ноцицепцию использовалась экспериментальная модель абдоминальной боли на крысах. Предполагается, что эта модель имитирует болевые ощущения, возникающие у пациентов, страдающих синдромом раздраженной кишки при сверхпороговом растяжении колоректального отдела толстого кишечника. При этом болевые ощущения как у человека, так и у животных сопровождаются рефлекторными висцеромоторными реакциями в виде сокращений брюшной мускулатуры, изменений частоты сердечных сокращений и артериального давления. Величина этих реакций зависит от величины давления в баллоне и связана со степенью выраженности абдоминальной боли [33–35]. Указанные висцеромоторные рефлексы реализуются с участием нейронов структур продолговатого мозга, в частности, каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга, реакции нейронов которой могут использоваться в качестве объективных критериев боли при изучении нейрональных механизмов висцеральной ноцицепции [27, 29–31, 36].

Опыты выполнены на двух группах крыс. Первая группа из 14 животных использовалась в качестве контрольной, вторая группа состояла из 8 крыс с экспериментальным колитом, вызванным трансректальным введением с помощью шприца Гамильтона спиртового раствора пикрилсульфониевой кислоты (20 мг в 0.2 мл 50%-ного этанола; TNBS, Sigma, США) в колоректальную область по методу Morris с соавт. [31, 32, 37]. Эксперименты начинались через 6–8 дней после введения TNBS, на пике развития колита.

После 24-часовой пищевой депривации со свободным доступом к воде животное анестезировалось уретаном, и после достижения хирургического уровня анестезии производилась установка катетеров в бедренные вену и артерию для введения анестетика (при необходимости) и для регистрации артериального давления с помощью полупроводникового датчика давления (MLT0670, ADInstruments Ltd., Великобритания). Затем животное помещалось в стереотаксический прибор (Medicor, Венгрия). Для доступа к продолговатому мозгу на дорсальной поверхности шеи делался разрез, шейные мышцы, часть затылочной кости над дорсальной поверхностью мозга, а также часть твердой мозговой оболочки аккуратно удалялись, после чего поверхность продолговатого мозга покрывалась теплым вазелиновым маслом. Для доступа к инфралимбической коре головного мозга в кости черепа в области проекции медиальной префронтальной коры на дорсальную поверхность черепа выполнялась краниотомия (2.5 × 1.5 мм), твердая мозговая оболочка надрезалась, и отверстие заполнялось теплым вазелиновым маслом. Адекватность анестезии контролировалось по стабильности артериального давления крови, которое поддерживалось в диапазоне 70–100 мм рт. ст. Температура тела животного поддерживалась в диапазоне 37–39°C с помощью специальной подложки и водяного термостата (U-10, Германия). Общая схема экспериментов представлена на рис. 1.

В качестве висцеральной стимуляции использовалось механическое растяжение колоректальной области толстой кишки (CRD – colorectal distension) с помощью тонкостенного резинового баллона объемом около 8 см^3, который вводился ректально и соединялся катетером со шприцевым насосом (DS-09, Visma-Planar, Беларусь). Катетер фиксировался липкой лентой на хвосте животного. Насос использовался для создания давления во внутрикишечном баллоне величиной 80 мм рт. ст. в течение 60 с, со скоростью нарастания давления около 10 с. По нашим данным,

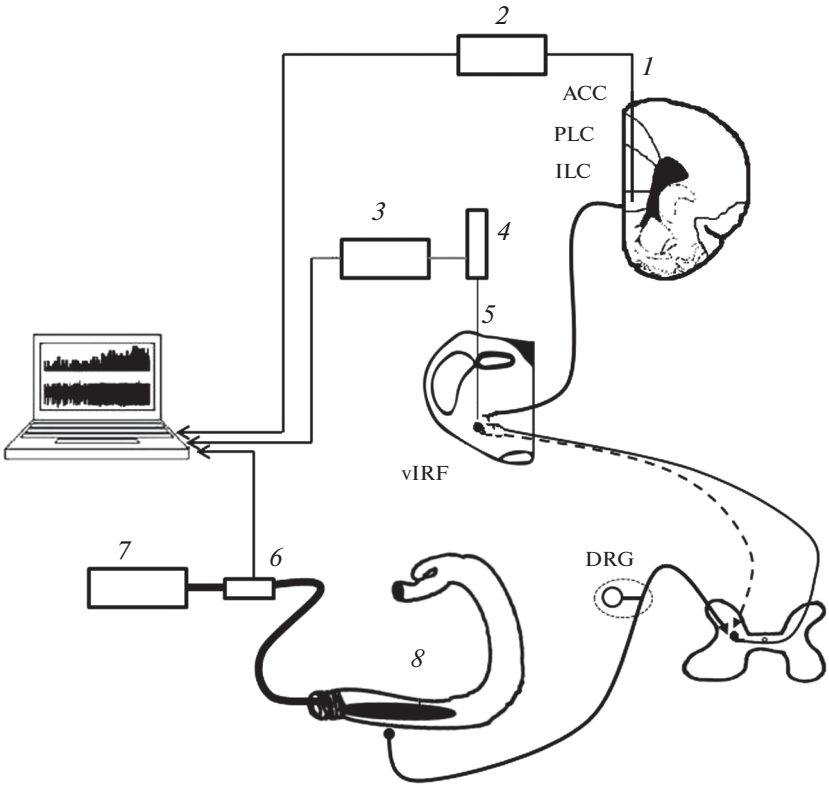


Рис. 1. Схема экспериментов по изучению эффектов электрической стимуляции инфралимбической коры на реакции ноцицептивных нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга, вызванные болевым колоректальным растяжением. Обозначения: *1* – стимулирующий электрод, *2* – электростимулятор A320, *3* – усилитель переменного тока DAM 80, *4* – микропогружатель МП2, *5* – регистрирующий электрод, *6* – полупроводниковый датчик давления, *7* – шприцевой насос DS-09, *8* – стимулирующий баллон, ACC – передняя поясная кора, PLC – прелимбическая кора, ILC – инфралимбическая кора, vlRF – каудальная вентролатеральная ретикулярная формация, DRG – ганглий дорсального рога.

Fig. 1. Scheme of experiments to study the effects of electrical stimulation of the infralimbic cortex on the responses of nociceptive neurons in the caudal ventrolateral medullary reticular formation caused by noxious colorectal distension. Designation: *1* – stimulating electrode, *2* – electrostimulator A320, *3* – AC amplifier DAM 80, *4* – microdriver MP2, *5* – recording electrode, *6* – semiconductor pressure sensor, *7* – syringe pump DS-09, *8* – stimulating balloon, ACC – anterior cingulate cortex, PLC – prelimbic cortex, ILC – infraralimbic cortex, vlRF – caudal ventrolateral medullary reticular formation, DRG – dorsal root ganglion.

указанное давление является ноцицептивным для толстого кишечника крысы [27]. Электрическая стимуляция инфралимбической коры осуществлялась с помощью вводимого в кору вольфрамового электрода сопротивлением около 50 кОм в области, ограниченной 2.0–3.5 мм рострально относительно брегмы, 0.5–1.0 мм латеральнее средней линии, 4.4–4.6 мм от дорсальной поверхности мозга. Кортикальная стимуляция производилась серией прямоугольных монополярных импульсов тока силой 100–150 мкА, длительностью 100–300 мкс и частотой следования 20 Гц в течение 10 с при помощи электростимулятора Isostim A320 (WPI, США), управляемого от компьютера.

Регистрация внеклеточной нейрональной активности осуществлялась вольфрамовым электродом (WPI, США) с кончиком диаметром около 1 мкм и сопротивлением около 1–2 МОм. Электрод с помощью электронного микропогружателя (МП2, Россия) погружался в ткань мозга в область, соответствующей каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга согласно атласу мозга крысы [38] и расположенной на 1.0–1.5 мм ростральнее задвижки, на 1.8–2.3 мм латеральнее средней линии, на глубину 2.7–3.4 мм относительно дорсальной поверхности мозга с шагом 4.0 мкм. Отводимый электродом сигнал поступал на вход усилителя (DAM 80, WPI, США) и после усиления и фильтрации в диапазоне 400–5000 Гц подавался на вход звуковой карты компьютера. Визуализация нейрональной активности осуществлялась в режиме реального времени с помощью программы Audition 3 (Adobe Corp., США) с последующим сохранением в формате звукового файла, который затем импортировался в программу Spike 2 (CED, Великобритания) для последующего анализа, обеспечивающего дифференциальную селекцию нейрональных разрядов по форме с раздельной обработкой импульсных потоков. Нейроны считались отвечающими на колоректальное растяжение, если частота их разрядов изменялась во время раздражения не менее чем на 10% по сравнению с фоновым значением. Оценка влияния электрической стимуляции коры на ноцицептивные реакции нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации и на изменения артериального давления, инициированные ноцицептивным колоректальным растяжением, осуществлялась в следующей парадигме. Сначала регистрировались реакции нейронов и изменения артериального давления на изолированное применение колоректального растяжения. Затем через 3–5 мин повторяли указанное растяжение с предшествующей (20 с) электрической стимуляцией инфралимбической коры. Расчет средних частот разрядов нейронов производился 60-секундными интервалами до, во время, а также после окончания колоректального растяжения, в этих же интервалах рассчитывались средние значения артериального давления. Соответствующие расчеты и графическое представление результатов производили с помощью программы Origin 2018 (OriginLab Corp., США). Статистический анализ и оценка достоверности результатов осуществляли с помощью программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США) с применением непараметрических статистических тестов. Результаты выражались как среднее значение ± ошибка среднего.

По окончании каждого эксперимента животное подвергалось эвтаназии внутривенным введением трехкратной дозы уретана, после чего выполнялось электролитическое разрушение ткани мозга через регистрирующий и стимулирующий электроды, мозг удалялся и помещался для фиксации в 10%-ный раствор параформальдегида в течение недели. Локализация мест регистрации и стимуляции производилась по 40 микронным срезам мозга, окрашенным тионином, с использованием атласа мозга крысы [38]. По завершении каждого опыта у здоровых крыс и животных с колитом выполнялся забор фрагмента толстой кишки длиной 8 см от ануса для визуального анализа и последующей стандартной гистологической обработки (эозин и гематоксилин) с целью исключения кишечной патологии у нормальных животных и гистологического подтверждения воспаления толстой кишки у крыс с колитом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе с использованием экспериментальной модели абдоминальной боли на крысах [33] изучали влияние электрической стимуляции инфралимбической коры на реакции нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга и изменения артериального давления, инициро-

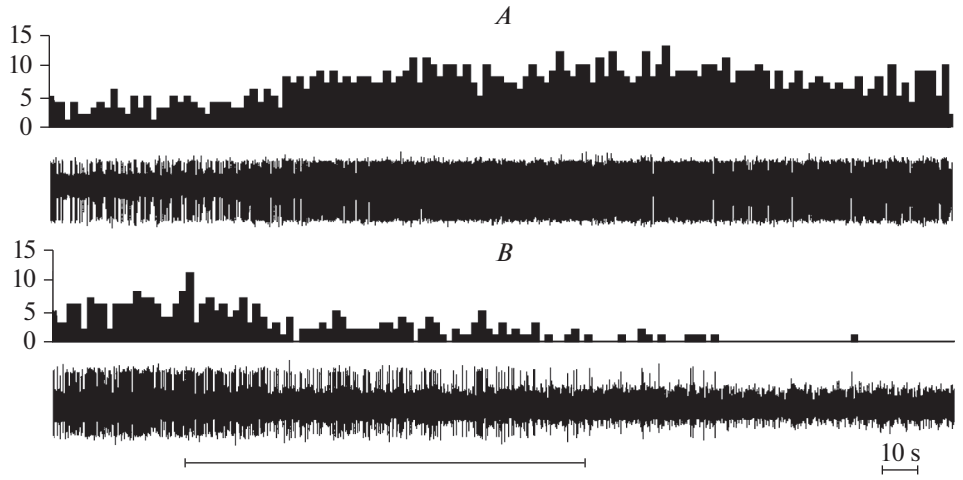


Рис. 2. Типичные примеры активности нейронов с возбудительным (*A*) и тормозным (*B*) типами реакции на ноцицептивное колоректальное растяжение. На каждой записи вверху диаграмма частоты разрядов, внизу соответствующая спайковая последовательность. По оси ординат – частота разрядов в с, абсцисса – время в с, отметка времени – 10 с, черта под рисунками – отметка растяжения.

Fig. 2. Typical examples of the activity of neurons with excitatory (*A*) and inhibitory (*B*) types of response to nociceptive colorectal distension. Each record has a discharge frequency diagram at the top, and a corresponding spike sequence at the bottom. The ordinate is the discharge frequency in spikes/s, the abscissa is the time in s, the time stamp is 10 s, the line under the figures is the colorectal distension mark.

ванные ноцицептивным растяжением колоректального отдела толстого кишечника крысы. Работа выполнялась на двух группах анестезированных уретаном самцах крыс. Первая (контрольная) группа состояла из 14 нормальных крыс (крысы без колита). Во вторую (экспериментальную) группу входили 8 крыс с колитом. У крыс первой группы была зарегистрирована фоновая и вызванная активность 232 нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации, из которых 112 нейронов, или 48.3%, отвечали на ноцицептивное колоректальное растяжение пролонгированным увеличением частоты разрядов (возбуждающиеся нейроны, рис. 2*A*), 48 нейронов, или 20.7%, отвечали пролонгированным уменьшением частоты разрядов (тормозящиеся нейроны, рис. 2*B*) и 72 нейрона, или 31% от общего числа нейронов, не отвечали на указанное колоректальное растяжение.

У животных второй группы была зарегистрирована фоновая и вызванная активность 189 нейронов, из которых 65 нейронов, или 34.4%, были возбуждающимися нейронами, 72 нейрона, или 38.1%, – тормозящимися и 52 нейрона, или 27.5% от общего числа нейронов, не отвечали на колоректальное растяжение. Таким образом, в каудальной вентролатеральной ретикулярной формации нами продемонстрированы два типа нейронов, связанных с висцеральной ноцицепцией: нейроны с пролонгированным возбуждением и нейроны с пролонгированным торможением на ноцицептивное колоректальное растяжение.

У крыс контрольной группы ноцицептивное колоректальное растяжение вызывало значительное увеличение частоты разрядов возбуждающихся нейронов до 135.7 ± 9.3% ($n = 112$, $p < 0.0001$, парный тест Вилкоксона) относительно их фоновой частоты разрядов, которое продолжалось и после окончания растяжения. Предшествующая колоректальному растяжению электрическая стимуляция инфралимбической коры сопровождалась существенным усилением нейрональных

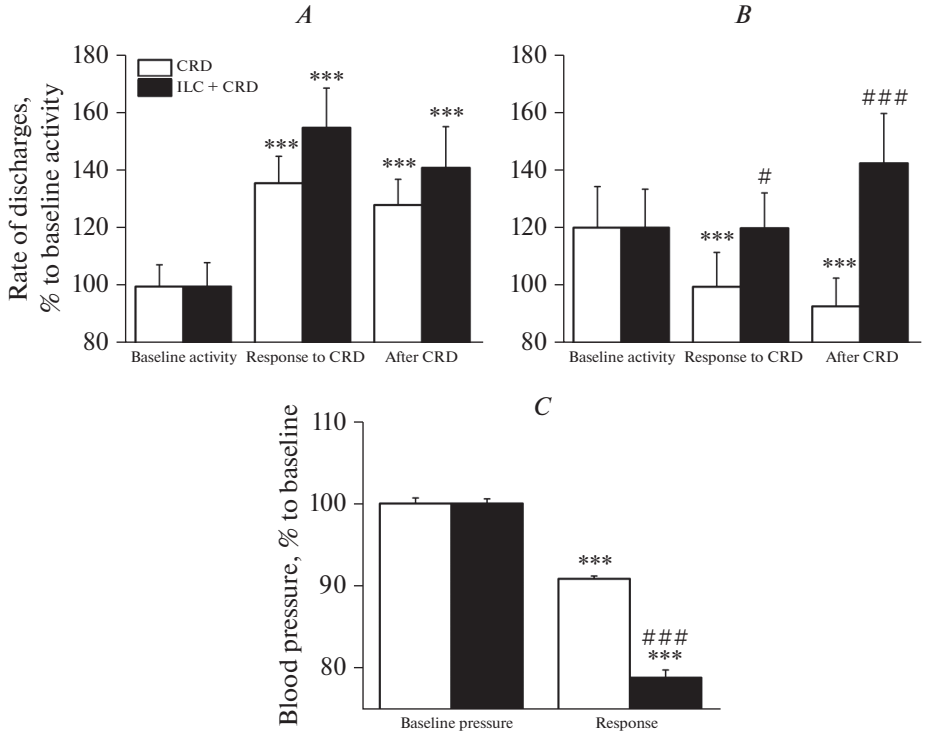


Рис. 3. Диаграммы изменении частоты разрядов нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга с возбудительным (*A*) и тормозным (*B*) типами реакции на CRD у контрольных крыс до (CRD) и после электрического раздражения инфралимбической коры (ILC + CRD). По оси ординат – частота разрядов в % к фоновой частоте; *** – $p < 0.001$ относительно фоновой частоты, # и ### – $p < 0.05$ и < 0.001 относительно изолированного применения ноцицептивного колоректального растяжения. На нижней диаграмме – соответствующие изменения артериального давления (*C*).

Fig. 3. Diagrams of changes in the rate of discharges of neurons of the caudal ventrolateral medullary reticular formation with excitatory (*A*) and inhibitory (*B*) types of response to the CRD in control rats before (CRD) and after electrical stimulation of the infralimbic cortex (ILC + CRD). The ordinate shows the rate of discharges in % to the background activity, *** – $p < 0.001$ relative to the background frequency, # and ### – $p < 0.05$ and < 0.001 relative to the isolated use of nociceptive colorectal distension. The bottom diagram shows the corresponding changes in blood pressure (*C*).

реакций на растяжение – до 155 ± 13.7% ($n = 112$, $p < 0.0001$, парный тест Вилкоксона) относительно фоновой активности, хотя это усиление не достигало значимого уровня ($n = 112$, $p = 0.95$, парный тест Вилкоксона) относительно реакции на изолированное колоректальное растяжение. При этом указанная тенденция сохранялась и после окончания растяжения (рис. 3*A*).

У нейронов с тормозными реакциями болевое колоректальное растяжение сопровождалось существенным уменьшением частоты разрядов до 79.5 ± 12% ($n = 48$, $p < 0.0001$, парный тест Вилкоксона) относительно фоновой частоты, которое продолжалось и после окончания растяжения. У нейронов этого типа предшествующая кортикальная стимуляция уменьшала тормозную реакцию нейронов на колоректальное растяжение до 99.8 ± 12.2% ($n = 48$, $p = 0.025$, парный тест Вилкоксона), относительно изолированного применения колоректального растяжения, которая

инвертировалась после окончания растяжения (рис. 3*B*). В контрольной группе животных ноцицептивное колоректальное растяжение сопровождалось существенным снижением артериального давления до 91 ± 0.34% ($p < 0.0001$, $U = 122$, критерий Манна–Уитни) относительно исходного значения. Предшествующая стимуляция инфралимбической коры приводила к достоверному усилению депрессорной реакции на колоректальное растяжение до 79 ± 0.9% ($p < 0.0001$, $U = 4.0$, критерий Манна–Уитни), относительно исходных значений. Это усиление достигало значимого уровня ($p < 0.0001$, U = 344.0, критерий Манна–Уитни) по отношению к изолированному применению колоректального растяжения (рис. 3*C*). Таким образом, в контрольной группе (нормальные крысы) электрическая стимуляция инфралимбической коры вызывала усиление нейрональных и депрессорных реакций на ноцицептивное растяжение толстой кишки. В группе животных с экспериментальным колитом ноцицептивное колоректальное растяжение вызывало достоверное увеличение частоты разрядов нейронов с возбудительной реакцией на растяжение до 148.7 ± 18.5%, ($n = 65$, $p < 0.0001$, парный тест Вилкоксона) относительно фоновой активности. Это увеличение частоты сохранялось после окончания растяжения. Предшествующая стимуляция инфралимбической коры незначительно увеличивала возбудительную реакцию этих нейронов на колоректальное растяжение (154.2 ± 22.1%, $n = 65$, $p < 0.0001$, парный тест Вилкоксона), относительно фонового значения, которое сохранялось и после прекращения растяжения (рис. 4*A*).

В этой группе крыс болевое колоректальное растяжение вызывало уменьшение частоты разрядов 72 нейронов до 66.5 ± 8.4% ($n = 72$, $p < 0.0001$, парный тест Вилкоксона) относительно фоновой активности, которое сохранялось после окончания растяжения. Предшествующая стимуляция инфралимбической коры вызывала уменьшение тормозной реакции на колоректальное растяжение практически до уровня фоновой активности (95.2 ± 17.7%, $n = 72$, $p = 0.56$, парный тест Вилкоксона), с последующей инверсией реакции на возбудительную, однако этот эффект не достигал достоверного уровня ($n = 72$, $p = 0.09$, парный тест Вилкоксона) (рис. 4*B*). В этой группе крыс ноцицептивное колоректальное растяжение также вызывало депрессорные изменения артериального давления, что выражалось в падении артериального давления до 95.2 ± 0.2% ($p < 0.0001$, $U = 357.0$, тест Манна–Уитни) относительно исходного значения. Эта реакция достоверно усиливалась после стимуляции инфралимбической коры (92.7 ± 1.1%, $p < 0.0001$, U = 46.0, тест Манна–Уитни) относительно исходных значений и ($p < 0.0001$, U = 2359.0, тест Манна–Уитни) относительно реакции на изолированное применение болевого колоректального растяжения (рис. 4*C*). Таким образом, в экспериментальной группе крыс электрическая стимуляция инфралимбической коры также характеризовалась облегчающим эффектом на нейрональные и депрессорные реакции на ноцицептивное растяжение толстой кишки. Вместе с тем, падение артериального давления в ответ на ноцицептивное колоректальное растяжение в группе крыс с колитом было достоверно меньше ($p = 0.0001$, $n_1 = 80$, $n_2 = 80$, $U = 668.0$, тест Манна–Уитни), чем в группе нормальных крыс. Электрическая стимуляция инфралимбической коры достоверно усиливала депрессорную реакцию как в группе нормальных крыс ($p = 0.0001$, $n_1 = 80$, $n_2 = 90$, $U = 294.0$, тест Манна–Уитни), так и в группе крыс с колитом ($p = 0.0001$, $n_1 = 80$, $n_2 = 80$, $U = 1288.0$, тест Манна–Уитни) (рис. 5). Это усиление депрессорной реакции было более выражено в группе нормальных крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время не вызывает сомнений, что инфралимбическая кора головного мозга имеет непосредственное отношение к высшим механизмам регуляции висцеральных функций и интеграции их в целостное поведение организма [1, 17, 39]. Вме-

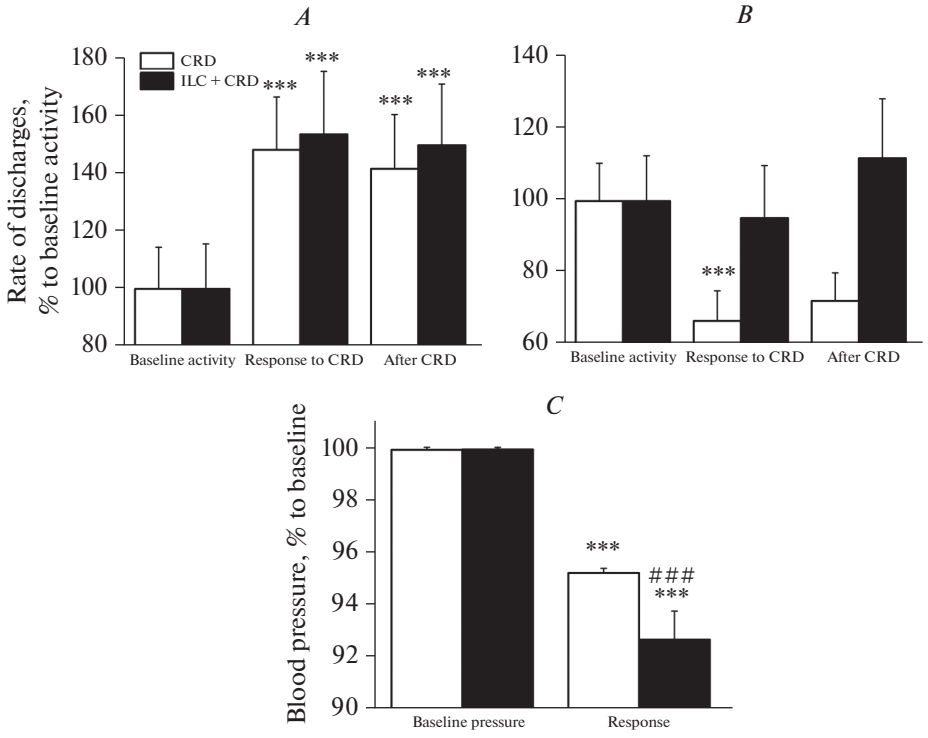


Рис. 4. Диаграммы изменений частоты разрядов нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга с возбудительным (*A*) и тормозным (*B*) типами реакции на CRD у крыс с колитом до (CRD) и после электрического раздражения инфралимбической коры (ILC + CRD). По оси ординат – частота разрядов в % к фоновой частоте; *** – $p < 0.001$ относительно фоновой частоты, # и ### – $p < 0.05$ и < 0.001 относительно изолированного применения ноцицептивного колоректального растяжения. На нижней диаграмме – соответствующие изменения артериального давления (*C*).

Fig. 4. Diagrams of changes in the rate of discharges of neurons of the caudal ventrolateral medullary reticular formation with excitatory (*A*) and inhibitory (*B*) types of response to the CRD in rats with colitis before (CRD) and after electrical stimulation of the infralimbic cortex (ILC + CRD). The ordinate shows the rate of discharges in % to the background activity, *** – $p < 0.001$, relative to the background frequency, # and ### – $p < 0.05$ and <0.001 relative to the isolated use of nociceptive colorectal distension. The bottom diagram shows the corresponding changes in blood pressure (*C*).

сте с тем, эта область коры также является интегральной частью эндогенной системы нисходящей модуляции боли, в том числе висцеральной [18, 20, 22, 25 , 40, 41]. Показано, что электрическая или химическая стимуляция инфралимбической коры может модулировать висцеральные ваго-вагальные рефлексы желудка [7], артериальное давление, частоту сердечных сокращений и дыхания, моторику желудка, частоту мочеиспускания и региональный кровоток [42–44], а также усиливать или тормозить висцеромоторные реакции на колоректальное растяжение у крыс [45]. Кроме того, часть эфферентных проекций инфралимбической коры оканчивается непосредственно на нейронах торакального отдела спинного мозга [46], поэтому влияние инфралимбической коры на ноцицепцию колоректальной области кишечника, которая получает иннервацию от нейронов люмбо-сакрального отдела спинного мозга, по-видимому, опосредуется через связи с другими структурами мозга, например, через прямые проекции к вентролатеральной ретику-

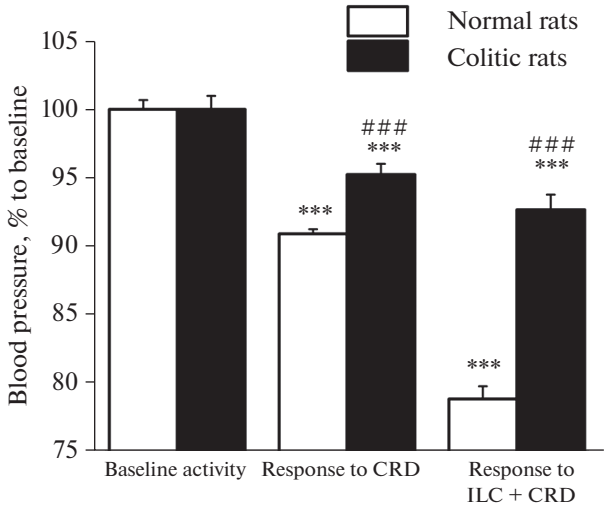


Рис. 5. Диаграмма изменений артериального давления в ответ на ноцицептивное колоректальное растяжение у нормальных крыс (белый столбик) и у крыс с колитом (черный столбик) до (CRD) и после (ILC + CRD) предварительной электрической стимуляции инфралимбической коры. По оси ординат – величина артериального давления в % к исходному значению; *** – $p < 0.001$ относительно исходных значений, ### – $p < 0.001$ относительно значений у нормальных крыс.

Fig. 5. Diagram of blood pressure changes to nociceptive colorectal distension in normal rats (white bar) and in rats with colitis (black bar) before (CRD) and after (ILC + CRD) preliminary electrical stimulation of the infralimbic cortex. The ordinate is the blood pressure in % to the baseline value; *** – $p < 0.001$, relative to baseline values, ### – $p < 0.001$ relative to values in normal rats.

лярной формации продолговатого мозга [11, 47], которая играет важную роль в системе эндогенного нисходящего контроля висцеральной ноцицепциии. Эта область продолговатого мозга через прямые реципрокные связи с торакальным отделом спинного мозга [25, 48] участвует в формировании кардиоваскулярных ответов на болевую периферическую стимуляцию, что дает основания рассматривать ее в качестве центра интеграции ноцицептивной и кардиоваскулярной систем [24, 49, 50]. Благодаря прямым связям с инфралимбической корой, гипоталамусом, центральным серым веществом, миндалиной и ядром одиночного тракта вентролатеральная ретикулярная формация опосредует нисходящую модуляцию висцеральной ноцицепции, координированную с другими функциями мозга.

Кроме того, в этой области продолговатого мозга оканчиваются терминали аксонов нейронов люмбо-сакрального отдела спинного мозга, получающих висцероцептивные, в том числе, и ноцицептивные афференты от толстого кишечника, проходящие в составе тазового нерва [51–53]. Вместе с тем, электрическая или химическая стимуляция вентролатеральной ретикулярной формации сопровождается торможением ответов нейронов люмбо-сакрального отдела спинного мозга на периферическую ноцицептивную стимуляцию [24, 50, 54].

Установлено, что ноцицептивное колоректальное растяжение вызывает существенные изменения c-Fos-иммунореактивности в вентролатеральной ретикулярной формации [55–58]. Ранее нами с использованием ноцицептивного колоректального растяжения, имитирующего абдоминальную боль, сопровождающую ряд функциональных заболеваний желудочно-кишечного тракта, например, синдром раздраженной кишки, было продемонстрировано участие нейронов вентролате-

ральной ретикулярной формации в механизмах серотонинергической модуляции абдоминальной боли в норме [27–30] и при кишечной патологии [31, 32].

В настоящей работе с использованием модели абдоминальной боли на наркотизированных крысах [33, 34] мы изучили влияние электрической стимуляции инфралимбической коры головного мозга на реакции нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга и изменения артериального давления крови, вызванные ноцицептивным растяжением колоректального отдела толстого кишечника. Эти реакции использовались нами в качестве нейронального и системного маркеров абдоминальной ноцицепции соответственно. Ранее показано, что у анестезированных уретаном крыс ноцицептивное периферическое раздражение сопровождается преимущественно снижением артериального давления, тогда как у бодрствующих крыс – его повышением [8, 33]. В настоящей работе нами продемонстрированы два типа нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации, отвечающих на ноцицептивное (80 мм рт. ст) колоректальное растяжение. Нейроны первого типа отвечали на растяжение пролонгированным увеличением, нейроны второго типа – пролонгированным уменьшением частоты разрядов. Как в группе нормальных крыс, так и в группе крыс с колитом, эти изменения продолжались в течение 30–60 с после окончания растяжения кишки и сопровождались депрессорными изменениями артериального давления. Ранее нами было показано, что при неболевом колоректальном растяжении (20 мм рт. ст.) значимых изменений как в нейрональной активности, так и в артериальном давлении не наблюдалось [27]. Нейроны с аналогичными реакциями на колоректальное растяжение [59, 60], на растяжение пищевода [61], желудка [62], мочеточника [63] и мочевого пузыря [64] были продемонстрированы в спинном мозге. Нейроны с пролонгированными реакциями на ноцицептивное колоректальное растяжение выявлены нами ранее в ядре одиночного тракта и в каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга [27–30, 65]. В данной работе мы подтвердили существование в каудальной вентролатеральной ретикулярной формации группы нейронов с пролонгированными возбудительными и тормозными реакциями на ноцицептивное колоректальное растяжение. Очевидно, что нейроны с подобными реакциями на ноцицептивное растяжение толстого кишечника имеют непосредственное отношение к висцеральной боли и могут рассматриваться как ноцицептивные в отношении к абдоминальной боли [26–28, 36, 65, 66]. Это подтверждается депрессорными реакциями, которые регистрировались нами и другими авторами на ноцицептивное колоректальное растяжение [27, 29, 30, 32, 33, 35]. Интересно, что обнаруженные нами в вентролатеральной ретикулярной формации два типа нейронов разнонаправленно изменяли частоту разрядов в реакции на ноцицептивное растяжение. Нами не обнаружено различий в локализации этих нейронов исследуемой области, более того, оба типа нейронов зачастую могли одновременно регистрироваться в одной и той же локализации. Можно предположить, что указанные нейроны прямо или косвенно получают возбуждающие ноцицептивные входы от люмбо-сакрального отдела спинного мозга. По-видимому, нейроны с тормозными реакциями на ноцицептивное растяжение кишки получают спинальный возбуждающий вход опосредованно тормозными, возможно, ГАМК-ергическими интернейронами [67, 68]. Можно предположить, что ноцицептивные нейроны каудальной вентролатеральной ретикулярной формации прямо или косвенно участвуют в механизме нисходящей модуляции висцеральной ноцицепции. Хотя точный механизм взаимодействия этих нейронов неясен, можно предположить, что обнаруженные нами два типа ноцицептивных нейронов входят во внутриядерную систему тормозящихся и возбуждающихся (катехоламинергических) нейронов [69], которые реципрокно связаны с висцероцептивными нейронами люмбо-са-

крального отдела спинного мозга и могут участвовать в динамической реализации висцеральных рефлексов на ноцицептивные периферические сигналы [70].

Функциональное состояние этих нейронов может динамически изменяться в зависимости от афферентной активности, поступающей в эту область продолговатого мозга и, в частности, от инфралимбической коры, модулируя тем самым спинальные механизмы ноцицепции и изменяя поток восходящей ноцицептивной информации в супраспинальные и кортикальные структуры [24, 70].

В данной работе впервые показано, что электрическая стимуляция инфралимбической коры у нормальных крыс сопровождается усилением ответов нейронов с возбудительной реакцией и уменьшением тормозных ответов нейронов с тормозным типом реакции в ответ на ноцицептивное колоректальное растяжение. Это позволяет говорить о возбуждающем влиянии инфралимбической коры на ноцицептивные нейроны каудальной вентролатеральной ретикулярной формации, иными словами, кортикальная стимуляция усиливает ноцицептивные реакции нейронов с возбудительным и уменьшает реакции нейронов с тормозным типом реакции на ноцицептивное колоректальное растяжение, очевидно, через прямые возбуждающие (глутаматергические) проекции инфралимбической коры к этим нейронам [70]. Это подтверждается и усилением депрессорной реакции на ноцицептивное колоректальное растяжение после предварительной кортикальной электрической стимуляции.

В целом, сходная картина наблюдалась и у крыс с экспериментальным колитом с той разницей, что реакции нейронов обоих типов на колоректальное растяжение в этом случае были несколько увеличенными, хотя это увеличение и не достигало достоверных значений. Следует добавить, что как у нормальных крыс, так и у крыс с колитом электрическая стимуляция инфралимбической коры оказывает облегчающее действие на системную реакцию в ответ на ноцицептивное растяжение кишки (усиление депрессорной реакции), причем этот эффект более выражен у нормальных крыс, чем у крыс с колитом.

Мы полагаем, что инфралимбическая кора, модулируя активность ноцицептивных нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга, изменяет баланс между возбудительными и тормозными процессами, который определяет конечный эффект (анти- или проноцицептивный) на уровне нейронов спинного мозга [71]. На системном уровне этот эффект выражается в соответствующем изменении артериального давления. В наших опытах кортикальная стимуляция вызывала усиление депрессорной реакции на ноцицептивное колоректальное растяжение, что может рассматриваться как проноцицептивное действие электрической стимуляции коры. Ранее предполагалось, что эндогенная антиноцицептивная система мозга, включающая в себя медиальную префронтальную кору и вентролатеральную ретикулярную формацию продолговатого мозга, и, как следует из названия, характеризовалась исключительно антиноцицептивным действием на периферические болевые раздражители [18, 72]. Однако последующие исследования показали, что активация этой системы может сопровождаться как анти-, так и проноцицептивным эффектом на периферическую ноцицепцию [22, 23, 40, 45, 73, 74]. Очевидно, что системным эффектам кортикального влияния на ноцицепцию могут соответствовать определенные нейрональные корреляты, регистрируемые в структурах мозга, связанных с нисходящей модуляцией ноцицепции, в нашем случае с каудальной вентролатеральной ретикулярной формацией продолговатого мозга. Это проявлялось в усилении ноцицептивных реакции нейронов с возбудительными и в уменьшении реакций нейронов с тормозными реакциями на ноцицептивное колоректальное растяжение соответственно. Вместе с тем становится очевидным, что рассмотрение эффектов кортикальной стимуляции на висцеральную ноцицепцию, оценивая только ее нейрональные корреляты без

учета системных реакций на боль, делает затруднительным интерпретацию конечных результатов.

Результаты данного исследования позволяют предположить, что одним из путей, посредством которого инфралимбическая кора может модулировать восходящие ноцицептивные сигналы от толстого кишечника, реализуется через прямые возбуждающие проекции к ноцицептивным нейронам каудальной вентролатеральной ретикулярной формации продолговатого мозга, которые прямо или косвенно опосредуют кортикальные эффекты на абдоминальную ноцицепцию. Что касается кардиоваскулярных эффектов, то скорее всего, кортикальная модуляция изменений артериального давления, инициированных болевым колоректальным растяжением, реализуется через прямые связи каудальной вентролатеральной ретикулярной формации с ее ростральным отделом и с цервикальным и торкальным отделами спинного мозга [75].

Таким образом, наши результаты показали, что инфралимбическая кора оказывает общее возбуждающее действие на вызванные болевым колоректальным растяжением ответы ноцицептивных нейронов вентролатеральной ретикулярной формации и на соответствующие депрессорные реакции как у нормальных крыс, так и у крыс с колитом. Установлено, что у крыс с колитом эффекты кортикальной стимуляции менее выражены, чем у нормальных животных. Функциональное значение подобных различий неясно, но можно предположить, что у животных с колитом эффекты стимуляции инфралимбической коры осложнены хроническим воспалением кишечника, которое, в свою очередь, может активировать эндогенную антиноцицептивную систему мозга, действующую в направлении, противоположном кортикальной стимуляции. Однако это предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий 2013–2020 гг. (GP-14, раздел 64).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Benarroch E.E.* The Central Autonomic Network: Functional Organization, Dysfunction, and Perspective. Mayo Clin. Proc. 68: 988–1001.1993.
2. *Terreberry R.R., Neafsey E.* The rat medial frontal cortex projects directly to autonomic regions of the brainstem. Brain Res. Bull. 19: 639-649. 1987.
3. *Heidbreder C.A., Groenewegen H.J.* The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorsoventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci. Biobehav. Rev. 27: 555–579.2003.
4. *Terreberry R.R., Neafsey E.J.* Rat medial frontal cortex: a visceral motor region with a direct projection to the solitary nucleus. Brain Res. 278: 245–249. 1983.
5. *Al Maskati H.A., Zbrozyna A.W.* Stimulation in prefrontal cortex area inhibits cardiovascular and motor components of the defense reaction in rats. J. Autonom. Nerv. System. 28: 117–126. 1989.
6. *Verberne A.M., Owens N.C.* Cortical modulation of the cardiovascular system. Progress Neurobiol. 54: 149–168. 1998.
7. *Panteleev S., Grundy D.* Descending influences from the infralimbic cortex on vago–vagal reflex control of gastric motor activity in the rat. Autonom. Neurosci.: Basic and Clinical. 86: 78–83. 2000.
8. *Tavares R.F., Antunes-Rodrigues J., de Aguiar Correa F.M.* Pressor Effects of Electrical Stimulation of Medial Prefrontal Cortex in Unanesthetized Rats. J. Neurosci. Res. 77: 613–620. 2004.
9. *Cassell M.D., Wright D.J.* Topography of Projections From the Medial Pretiontal Cortex to the Amygdale in the Rat. Brain Res. Bull. 17: 321–333. 1986.
10. *Sesack S.R., Deutch A.Y., Roth R.H., Bunney B.S.* Topographical Organization of the Efferent Projections of the Medial Prefrontal Cortex in the Rat: An Anterograde Tract-Tracing Study With Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin. J. Compar. Neurol. 290: 213–242. 1989.

11. *Hurley K.M., Herbert H., Moga M.M., Saper C.B.* Efferent Projections of the Infralimbic Cortex of the Rat. J. Compar. Neurol. 308: 249–276.1991.
12. *Takagishi M., Chiba T.* Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. Brain Res. 566: 26–39. 1991.
13. *Groenewegen H.J., Uylings H.B.M.* The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. Progr. Brain Res. 126: 3–28. 2000.
14. *Gabbott P.L.A., Warner T.A., Jays P.R.L., Bacon S.J.* Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. Brain Res. 993: 59–71. 2003.
15. *Gabbott P.L.A., Warner T.A., Jays P.R.L., Salway P., Busby S.J.* Prefrontal Cortex in the Rat: Projections to Subcortical Autonomic, Motor, and Limbic Centers. J. Compar. Neurol. 492: 145–177. 2005.
16. *Vertes R.P.* Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. Synapse. 51: 32–58. 2004.
17. *McKlveen J.M., Myers B., Herman J.P.* The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. J. Neuroendocrinol. 27: 446–456. 2015.
18. *Sandkuhler J.* The organization and function of endogenous antinociceptive systems. Progr. Neurobiol. 50: 49–81.1996.
19. *Millan M.J.* Descending control of pain. Progr. Neurobiol. 66: 355–474. 2002.
20. *Benarroch E.E.* Pain-autonomic interactions. Neurol. Sci. 27: S130–S133. 2006.
21. *Ossipov M.H., Dussor G.O., Porreca F.* Central modulation of pain. J. Clin. Invest. 120(11): 3779–3787. 2010.
22. *Patel R., Dickenson A.H.* A study of cortical and brainstem mechanisms of diffuse noxious inhibitory controls in anaesthetized normal and neuropathic rats. Eur. J. Neurosci. 00: 1–11. 2019.
23. *Heinricher M.M., Tavares I., Leith J.L., Lumb B.M.* Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. Brain Res. Rev. 60: 214 – 225. 2009.
24. *Tavares I., Lima D.* The Caudal Ventrolateral Medulla as an Important Inhibitory Modulator of Pain Transmission in the Spinal Cord. Pain. 3(5): 337–346. 2002.
25. *Tavares I., Lima D.* From neuroanatomy to gene therapy: searching for new ways to manipulate the supraspinal endogenous pain modulatory system. J. Anat. 211: 261-268. 2007.
26. *Ness T.J., Follett K.A., Piper J., Dirks B.A.* Characterization of neurons in the area of the medullary lateral reticular nucleus responsive to noxious visceral and cutaneous stimuli. Brain Res. 802: 163–174. 1998.
27. *Panteleev S.S., Martseva A.A., Lyubashina O.A.* The inhibitory effect of granisetron on ventrolateral medulla neuron responses to colorectal distension in rats. Eur. J. Pharmacol. 749: 49–55. 2015.
28. *Любашина О.А., Сиваченко И.Б., Пантелеев С.С., Ноздрачев А.Д.* Эффекты блокады 5-HT3-рецепторов на висцеральные ноцицептивные нейроны вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга крысы. Журн. эволюц. биохим. физиол. 52(4): 281–291. 2016. [*Lyubashina O.A., Sivachenko I.B., Panteleev S.S., Nozdrachev A.D.* Effects of 5-HT3 receptor blockade on visceral nociceptive neurons in the ventrolateral reticular region of the rat medulla oblongata. Zhurn. Evoliuts. Biokhimii i Fiziologii. 52(4): 281–291. 2016. (In Russ)].
29. *Lyubashina O.A., Sivachenko I.B.* The 5-HT4 receptor-mediated inhibition of visceral nociceptive neurons in the rat caudal ventrolateral medulla. Neuroscience. 359: 277–288. 2017. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.039
30. *Panteleev S.S., Sivachenko I.B., Lyubashina O.A.* The central effects of buspirone on abdominal pain in rats. Neurogastroenterol. & Motility. 30: e13431. 2018.
31. *Lyubashina O.A., Sivachenko I.B., Busygina I.I., Panteleev S.S.* Colitis-induced alterations in response properties of visceral nociceptive neurons in the rat caudal medulla oblongata and their modulation by 5-HT3 receptor blockade. Brain Res. Bull. 142: 183–196. 2018.
32. *Lyubashina O.A., Sivachenko I.B., Sokolov A.Y.* Differential responses of neurons in the rat caudal ventrolateral medulla to visceral and somatic noxious stimuli and their alterations in colitis. Brain Res. Bull. 152: 299–310. 2019.
33. *Ness T.J., Gebhart G.F.* Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudaffective reflexes in the rat. Brain Res. 450: 153–169. 1988.
34. *Ness T.J., Randich A., Gebhart G.F.* Further behavioral evidence that colorectal distension is a 'noxious' visceral stimulus in rats. Neurosci. Lett.131: 113–116. 1991.
35. *Sivarao D.V., Langdon S., Bernard C., Lodge N.* Colorectal distension-induced pseudoaffective changes as indices of nociception in the anesthetized female rat: morphine and strain effects on visceral sensitivity. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 56: 43–50. 2007.

36. *Ness T.J., Piper J.G., Follett K.A.* The effect of spinal analgesia on visceral nociceptive neurons in caudal medulla of the rat. Anesth. Analg. 89: 721–726. 1999.
37. *Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R., Wallace J.L.* Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology. 96(3): 795–803. 1989.
38. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. London. Acad. Press. 1998.
39. *Cechetto D.F.* Cortical control of the autonomic nervous system. Exp. Physiol. 99(2): 326–331. 2014.
40. *Robinson D.A., Calejesan A.A., Wei F., Gebhart G.F., Zhuo M.* Endogenous Facilitation: From Molecular Mechanisms to Persistent Pain. Current Neurovasc. Res. 1: 11–20. 2004.
41. *Pinto M., Lima D., Tavares I.* Neuronal activation at the spinal cord and medullary pain control centers after joint stimulation: a c-fos study in acute and chronic articular inflammation. Neuroscience.147: 1076–1089. 2007.
42. *Hurley-Gius K.M., Neafsey E.J.* The Medial Frontal Cortex and Gastric Motility: Microstimulation Results and Their Possible for the Overall Pattern of Organization of Rat. Frontal and Parietal Cortex. Brain Res. 365: 241–248. 1986.
43. *Frysztak R.J., Neafsey E.J.* The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. Brain Res. 643: 181–193. 1994.
44. *Owens N.C., Verberne A.J.M.* An electrophysiological study of the medial prefrontal cortical projection to the nucleus of the solitary tract in rat. Exp. Brain Res. 110: 55–61. 1996.
45. *Cao Z., Wu X., Chen S., Fan J., Zhang R., Owyang C., Li Y.* Anterior Cingulate Cortex Modulates Visceral Pain as Measured by Visceromotor Responses in Viscerally Hypersensitive Rats. Gastroenterology. 134: 535–543. 2008.
46. *Bacon S.J., Smith A.D.* A monosynaptic pathway from an identified vasomotor centre in the medial prefrontal cortex to an autonomic area in the thoracic spinal cord. Neuroscience. 54(3): 719–728. 1993.
47. *Verberne A.J.M.* Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat. Am. J. Physiol. 270: R713–R719. 1996.
48. *Tavares I., Lima D.* Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord. Exp. Brain Res. 99: 455–463. 1994.
49. *Ciriello J., Caverson M.M.* Bidirectional cardiovascular connections between ventrolateral medulla and nucleus of the solitary tract. Brain Res. 367: 273–281. 1986.
50. *Siddall P.J., Polson J.W., Dampney R.A.* Descending antinociceptive pathway from the rostral ventrolateral medulla: a correlative anatomical and physiological study. Brain Res. 645: 61–68. 1994.
51. *Ermirio R., Ruggeri P., Molinari C., Weaver L. C.* Somatic and visceral inputs to neurons of the rostral ventrolateral medulla. Am. J. Physiol. 265: R35–R40. 1993.
52. *Martinez V., Wang L., Mayer E., Tache Y.* Proximal colon distention increases Fos expression in the lumbosacral spinal cord and activates sacral parasympathetic NADPHd-positive neurons in rats. J. Comp. Neurol. 390: 311–321. 1998.
53. *Wang C.-C., Willis W.D., Westlund A.N.* Ascending Projections From the Area Around the Spinal Cord Central Canal: A Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin Study in Rats. J. Compar. Neurol. 415: 341–367. 1999.
54. *Lovick T.A.* Analgesia and the Cardiovascular Changes Evoked by Stimulating Neurones in the Ventrolateral Medulla in Rats. Pain. 25: 259–268. 1986.
55. *Rodella L., Rezzani R., Gioia M., Tredici G., Bianchi R.* Expression of Fos immunoreactivity in the rat supraspinal regions following noxious visceral stimulation Brain Res. Bull. 47(4): 357–366. 1998.
56. *Monnikes H., Ruter J., Konig M., Grote C., Kobelt P., Klapp B.F., Arnold R., Wiedenmann B., Tebbe J.J.* Differential induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension: role of afferent C-fibers and 5-HT receptors. Brain Res. 966: 253–264. 2003.
57. *Wang L., Martínez V., Larauche M., Taché Y.* Proximal colon distension induces Fos expression in oxytocin-,vasopressin-, CRF- and catecholamines-containing neurons in rat brain. Brain Res. 1247: 79–91. 2009.
58. *Lyubashina O., Atanasova D., Panteleev S., Itzev D., Lazarov N.* Differential c-fos expression in nuclei of the caudal medulla oblongata following noxious colorectal distension in anaesthetized rats. Compt. rendus de l'Academ. bulgare des Sci. 65: 709–716. 2012.
59. *Berkley K.J., Hubscher C.H., Wall P.D.* Neuronal responses to stimulation of the cervix, uterus, colon, and skin in the rat spinal cord. J. Neurophysiol. 69: 545–556. 1993.
60. *Ji Y., Traub R.J.* Differential effects of spinal CNQX on two populations of dorsal horn neurons responding to colorectal distension in the rat. Pain. 99: 217–222. 2002.
61. *Qin C., Chandler M.J., Jou C.J., Foreman R.D.* Responses and afferent pathways of C1-C2 spinal neurons to cervical and thoracic esophageal stimulation in rats. J. Neurophysiol. 91: 2227–2235. 2004.

62. *Qin C., Chandler M.J., Miller K.E., Foreman R.D.* Responses and afferent pathways of C(1)-C(2) spinal neurons to gastric distension in rats. Auton. Neurosci. 104: 128–136. 2003.
63. *Laird J.M., Roza C., Cervero F.* Spinal dorsal horn neurons responding to noxious distension of the ureter in anesthetized rats. J. Neurophysiol. 76: 3239–3248. 1996.
64. *Ness T.J., Castroman P.* Evidence for two populations of rat spinal dorsal horn neurons excited by urinary bladder distension. Brain Res. 923: 147–156. 2001.
65. *Panteleev S.S., Martseva A.A., Lyubashina O.A.* Responses of Solitary Tract Nucleus Neurons to Nociceptive Stimuli of the Large Intestine in Rats. Neurosci. Behav. Physiol. 43(6): 775–781. 2013.
66. *Ness T.J., Gebhart G.F.* Characterization of neuronal responses to noxious visceral and somatic stimuli in the medial lumbosacral spinal cord of the rat. J. Neurophysiol. 57: 1867–1892. 1987.
67. *Millhorn D.E., Hokfelt T., Seroogy K., Oertel W., Verhofstad A.A., Wu J.Y.* Immunohistochemical evidence for colocalization of gamma-aminobutyric acid and serotonin in neurons of the ventral medulla oblongata projecting to the spinal cord. Brain Res. 410: 179–185. 1987.
68. *Owens N.C., Verberne A.J.M.* Medial prefrontal depressor response: involvement of the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. J. Autonom. Nerv. System. 78: 86–93. 2000.
69. *Gabbott P.L.A., Warner T., Busby S.J.* Catecholaminergic neurons in medullary nuclei are among the post-synaptic targets of descending projections from infralimbic area 25 of the rat medial prefrontal cortex. Neuroscience. 144: 623–635. 2007.
70. *Yelle M.D., Oshiro Y., Kraft R.A., Coghill R.C.* Temporal filtering of nociceptive information by dynamic activation of endogenous pain modulatory systems. J. Neurosci. 29: 10264–10271. 2009.
71. *Castro A.R., Morgado C., Lima D., Tavares I.* Differential expression of NK1 and GABAB receptors in spinal neurones projecting to antinociceptive or pronociceptive medullary centres. Brain Res. Bull. 69: 266–275. 2006.
72. *Stamford J.A.* Descending control of pain. Br. J. Anaesth. 75: 217–227. 1995.
73. *Zhang L., Zhang Y., Zhao Z.* Anterior cingulate cortex contributes to the descending facilitatory modulation of pain via dorsal reticular nucleus. Eur. J. Neurosci. 22: 1141–1148. 2005.
74. *Calejesan A.A., Kim S.J., Zhuo M.* Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. Eur. J. Pain. 4: 83–96. 2000.
75. *Tavares I., Lima D., Coimbra A.* The Ventrolateral Medulla of the Rat Is Connected With the Spinal Cord Dorsal Horn by an Indirect Descending Pathway Relayed in the A5 Noradrenergic Cell Group. J. Compar. Neurol. 374: 34–95. 1996.

Effects of the Infralimbic Cortex Stimulation on the Caudal Ventrolateral Reticular Formation Neuron Responses to the Nociceptive Rat Colon Distension

S. S. Panteleev[a], *, I. B. Sivachenko[a], I. I. Busygina[a], and O. A. Lyubashina[a, b]

[a] *Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*
[b] *Valdman Institute of Pharmacology, First Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia*
**e-mail: panteleev0@gmail.com*

The infralimbic cortex of the cerebral hemispheres is characterized by an extensive system of afferent and efferent connections with cortical, subcortical, bainstem structures and the spinal cord, which ensure its participation in the higher mechanisms of regulation of the functions of the visceral sphere. At the same time, the involvement of the infralimbic cortex in the mechanisms of cortical modulation of visceral nociception, both acute and chronic, seems to be poorly understood. In this work, using an experimental model of abdominal pain on two groups of urethane anesthetized rats (normal rats and rats with experimental colitis), we studied the effects of electrical stimulation of the infralimbic cortex on the neuronal (responses of neurons of the caudal ventrolateral reticular formation) and systemic (changes in arterial blood pressure) reactions induced by nociceptive distension of the colorectal region of colon. It has been found that in rats of both groups nociceptive colorectal distension was accompanied by both excitatory and inhibitory reactions of neurons of the ventrolateral reticular formation, as well as depressor changes in blood pressure. Electrical stimulation of the infralimbic cortex increased excitatory and decreased inhibitory neuronal responses to visceral painful stimulation and also enhanced nociceptive depressor responses in both normal rats and rats with

colitis. This effect was more pronounced in the group of healthy animals. In general, the influence of the infralimbic cortex on nociceptive neurons of the ventrolateral reticular formation and vascular responses to visceral pain can be considered as facilitating visceral nociception. Quantitative differences in the effects of cortical stimulation in normal rats and rats with colitis are possibly related to differences in the brain processing of acute visceral pain and pain complicated by chronic inflammation. One of the possible mechanisms of cortical influence on visceral nociception may be modulation of the current activity of nociceptive neurons of the caudal ventrolateral reticular formation, directly or indirectly involved in the descending control of visceral pain.

Keywords: infralimbic cortex, caudal ventrolateral reticular formation, visceral pain, neuronal activity, colon, colitis

ЦИТИРОВАТЬ:

Пантелеев С.С., Сиваченко И.Б., Бусыгина И.И., Любашина О.А. Эффекты стимуляции инфралимбической коры на реакции нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации, вызванные ноцицептивным раздражением толстой кишки крысы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1524–1540.

DOI: 10.31857/S0869813920120067

TO CITE THIS ARTICLE:

Panteleev S.S., Sivachenko I.B., Busygina I.I., Lyubashina O.A. Effects of the Infralimbic Cortex Stimulation on the Caudal Ventrolateral Reticular Formation Neuron Responses to the Nociceptive Rat Colon Distension. Russian Journal of Physiology. 106(12): 1524–1540.

DOI: 10.31857/S0869813920120067

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1541–1552

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ГЕНЕРАЛИЗАЦИЯ СТРАХА ОБСТАНОВКИ ЗАВИСИТ ОТ АКТИВНОСТИ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ

© 2020 г. Н. Б. Саульская[1], *, О. Э. Марчук[1]

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

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

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.
После доработки 18.09.2020 г.
Принята к публикации 05.10.2020 г.

Медиальная префронтальная кора (мПК) участвует в регуляции генерализации страха. Ранее мы показали, что формирование генерализованного страха в ответ на звуковые сигналы находится под контролем серотониновой системы мПК, поскольку ее фармакологическая активация во время выработки условной реакции страха (УРС – модель страха) усиливает на этапе тестирования проявления страха, вызываемого безопасными звуковыми стимулами. Цель настоящей работы заключалась в выяснении, вовлекается ли серотониновая система мПК в процесс генерализации страха обстановки. На крысах линии Спрег–Доули методом прижизненного внутримозгового микродиализа показано, что помещение животных в потенциально опасную камеру А, в которой ранее у них вырабатывали УРС (сочетание условного сигнала с неизбегаемым электрокожным раздражением), сопровождается подъемом уровня внеклеточного серотонина в мПК и вызывает замирание животных (показатель страха обстановки). Помещение этих же животных в безопасную дифференцировочную камеру Б тоже приводило к подъему уровня внеклеточного серотонина в мПК и вызывало замирание животных (показатель генерализованного страха обстановки). Введение в мПК во время выработки УРС флуоксетина (1 мкМ), селективного ингибитора обратного захвата серотонина, увеличивало на этапе тестирования замирание животных в безопасной камере Б, но не влияла на замирание в камере А. Такое фармакологическое воздействие не изменяло выраженность подъемов уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызываемых пребыванием в камерах А и Б. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация серотониновой системы мПК при формировании страха влияет на степень генерализации страха обстановки. Кроме того, наши результаты позволяют предположить, что усиление активности серотониновой системы мПК безопасными обстановочными стимулами может быть одним из нейрохимических проявлений генерализованного страха обстановки.

Ключевые слова: медиальная префронтальная кора, прижизненный внутримозговой микродиализ, выброс серотонина, условная реакция страха, флуоксетин, генерализация страха обстановки

DOI: 10.31857/S0869813920120080

Работы последнего времени, выполненные на лабораторных животных и здоровых испытуемых, продемонстрировали важную роль медиальной префронтальной коры (мПК) в дискриминации потенциально опасных и безопасных внешних сиг-

налов [1–3]. Дефицит этого процесса, связанный с дефицитом дифференцировочного торможения, приводит к генерализации страха, которая выражается в проявлениях страха на безопасные стимулы. В исследованиях на животных установлено, что генерализация страха тем сильнее, чем сильнее стрессовое воздействие, порождающее страх [4]. В соответствии с этим в клинике чрезмерная и стойкая генерализация страха отмечена у пациентов с посттравматическими стрессовыми расстройствами, перенесшими тяжелую психоэмоциональную травму [5–7]. Причем, у таких пациентов ухудшение дискриминации опасных и безопасных дискретных сигналов (звуковых, световых и т.д.) сопровождается нарушением взаимодействия амигдалы и мПК [8] и усилением активации дорсального отдела мПК безопасными внешними стимулами [7]. Эти данные свидетельствуют о значимости мПК для контроля генерализации страха, вызываемого такими сигналами, не только в норме, но и при психопатологии.

Ранее мы показали, что формирование генерализованного страха на звуковые сигналы зависит от активности серотониновой системы мПК, поскольку введение в эту область во время выработки условной реакции страха (УРС) селективного ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина, увеличивающего уровень внеклеточного серотонина в мПК, усиливает на этапе тестирования проявления страха, вызываемые безопасными звуковыми стимулами [9]. Вместе с тем, мПК является важным центром обработки полимодальных контекстуальных сигналов, приходящих из гиппокампальной формации [2], и, согласно результатам недавних исследований, выполненных методами инактивации и разрушений, вовлечена в формирование генерализованного страха обстановки [10, 11]. Изучение новых нейрохимических механизмов такого участия является актуальной задачей, поскольку при психопатологии обстановочные стимулы зачастую выполняют роль триггера, запускающего травматизирующие воспоминания и проявления страха [12].

Наши прежние данные свидетельствуют, что серотонинергический вход, возможно, оказывает влияние на префронтальную регуляцию генерализации страха обстановки [13]. А именно, мы установили, что выработка УРС сопровождается выбросом серотонина в мПК, величина которого выше у животных, демонстрирующих на этапе тестирования высокую генерализацию страха обстановки (большее замирание в безопасной дифференцировочной камере Б), и меньше у крыс с низкой генерализацией страха обстановки (меньшее замирание в камере Б), но она не коррелирует с замиранием в потенциально опасной камере А [13]. Эти данные, полученные на основе выявленных корреляций, позволяют предполагать, но не доказывают, что сопутствующая выработке УРС активация серотониновой системы мПК усиливает последующую генерализацию страха обстановки. Цель настоящей работы состояла в дальнейшей проверке этого предположения. В работе для выяснения взаимосвязи между активностью серотониновой системы мПК и генерализацией страха обстановки было изучено влияние локальной фармакологической стимуляции серотониновой системы мПК во время выработки УРС локальным введением флуоксетина (методический подход, использованный нами ранее [9]) на последующие проявления страха обстановки и на генерализацию страха обстановки (замирание в опасной условнорефлекторной камере и в безопасной дифференцировочной камере соответственно), а также на изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе этих тестов. Такие сведения в литературе отсутствуют.

Новизна данной работы заключается в том, что в ней впервые исследованы изменения активности серотониновой системы мПК (по показателю уровня внеклеточного серотонина) в ходе проявлений генерализованного страха обстановки, а также впервые изучено влияние фармакологической стимуляции серотониновой системы мПК во время выработки УРС (модель формирования страха) на последующую генерализацию страха обстановки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах-самцах линии Спрег–Доули массой 300–380 г из биоколлекции “Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Исследования проводили в соответствии с международными нормами гуманного обращения с лабораторными животными, отраженными в Базельской декларации, и рекомендациями комиссии по работе с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Были предприняты все усилия для минимизации страданий животных и для уменьшения числа используемых животных. Животных содержали при свободном доступе к воде и корму в условиях естественного светового режима (свет в 8.00 в течение 12 ч).

В работе использовали метод прижизненного внутримозгового микродиализа. Животным под наркозом унилатерально имплантировали концентрические диализные канюли в мПК, как описано ранее [14]. На следующий день (этап обучения) каждую крысу, находящуюся в дневной домашней клетке, подключали к диализному насосу SP-300 (Next Advance, США) и начинали диализную перфузию мПК искусственной спинномозговой жидкостью [15] со скоростью 1 мкл/мин. На этом этапе животных разделяли на группы – две экспериментальных и одну контрольную. У животных экспериментальной группы 1 (n = 10) вырабатывали УРС с дискриминационным компонентом, как описано ранее [9]. Коротко, каждую крысу помещали в условнорефлекторную камеру А с решетчатым покрытием пола на 5 мин, где один раз в минуту предъявляли звуковой условный сигнал – непрерывный тон (1000 Гц, 10 с, 5 раз), который сочетали с электрокожным раздражением лап (1.5 мА, 1 с, 5 раз). Затем животных пересаживали в дневную домашнюю клетку и через 100 мин проводили дифференцировочную сессию: каждую крысу помещали на 5 мин в дифференцировочную камеру Б, где раз в минуту предъявляли дифференцировочный сигнал – прерывистый тон (1000 Гц, 10 с, 5 раз) без электрокожного раздражения. Через 5 мин крысу возвращали в дневную домашнюю клетку на 70 мин. На этом этап обучения заканчивали. С животными контрольной группы (n = 7) проводили те же процедуры, что и с крысами экспериментальной группы 1, но без электрокожного раздражения.

Животным экспериментальной группы 2 (n = 7) в первый день эксперимента в искусственную спинномозговую жидкость для перфузии мПК добавляли флуоксетин (1 мкМ; Sigma, США), селективный ингибитор транспортеров серотонина, в концентрации и по схеме, использованных нами ранее [9]. А именно, через час после начала введения проводили сначала выработку УРС, а через 100 мин после нее – дифференцировочную сессию, как описано для экспериментальной группы 1. Через 70 мин после окончания дифференцировочной сессии перфузионную жидкость, содержащую флуоксетин, заменяли на искусственную спинномозговую жидкость и проводили отмывку канюли и тканей мозга от флуоксетина в течение 30 мин. После этого эксперимент завершали.

Через два дня (этап тестирования) животных подключали к диализному насосу, подающему искусственную спинномозговую жидкость. После стабилизационного периода (1 ч) собирали 4 фоновых порций диализата (по 15 мин) для определения фонового уровня внеклеточного серотонина перед поведенческими тестами. Затем крыс экспериментальной группы 1 и экспериментальной группы 2 тестировали на генерализацию условнорефлекторного страха обстановки. Для этого каждое животное помещали на 5 мин в дифференцировочную камеру Б, не ассоциируемую с болевым раздражением. Звуковых сигналов в этом тесте не предъявляли. Затем животное возвращали в дневную домашнюю клетку. Через 70 мин крысу тестировали на проявления условнорефлекторного страха обстановки, помещая на 5 мин в

условнорефлекторную камеру А, ранее сочетавшуюся с болевым раздражением. Звуковых сигналов и болевого раздражения в этом тесте не предъявляли. После этого животное возвращали в дневную домашнюю клетку и через 55 мин эксперимент завершали. С животными контрольной группы ($n = 7$) на этом этапе проводили те же процедуры, что и с крысами экспериментальной группы 1 и 2. На этапе тестирования диализат собирали каждые 15 мин в течение всего экспериментального дня и немедленно анализировали на содержание серотонина.

Во время поведенческих тестов проводили видеорегистрацию поведения на персональном компьютере с помощью веб-камеры (Logitec, Китай). Регистрировали длительность замирания (с) во время пребывания в дифференцировочной камере Б и условнорефлекторной камере А, параметр, отражающий ожидание болевого раздражения в заведомо безопасной (камера Б) и потенциально опасной (камера А) обстановке.

Определение уровня серотонина в диализате мПК осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Использовали хроматографическую систему (Shimadzu, Германия) и параметры хроматографического анализа, описанные нами ранее [9]. Регистрацию и обработку хроматограмм проводили в режиме реального времени (МультиХром 1.72, Амперсенд, Россия). Содержание серотонина в каждой диализной пробе выражали в нМ/л, а затем – в процентах по отношению к собственному среднему фоновому уровню. По завершении экспериментов животных подвергали эвтаназии (рометар, 1.4 мг/100 г массы; золетил, 5 мг/100 г массы, внутримышечно; уретан, 0.2 г/100 г массы, внутрибрюшинно). Мозг извлекали и помещали в водный 10%-ный раствор формалина для последующего морфологического контроля попаданий. В обработку были включены крысы с локализацией диализного участка канюль в мПК (преимущественно прелимбическая кора).

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием статистического пакета SigmaStat (3.0). Данные выражали как среднее ± стандартная ошибка среднего. Сравнение изменений уровня внеклеточного серотонина относительно фонового уровня проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (фактор – время; F-критерий) с последующим сравнением изменений в отдельных временны́х точках относительно фона по t-критерию Бонферрони. Межгрупповое сравнение проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа (первый фактор – группа, второй фактор – время, F-критерий) с последующим сравнением групп в конкретных временны́х точках по t-критерию Бонферрони. Сравнение параметров поведения осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Помещение крыс экспериментальной группы 1 на этапе тестирования в безопасную дифференцировочную камеру Б сопровождалось подъемом уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно собственного фонового уровня перед тестом (рис. 1*А*; $F_{(8, 72)} = 7.5$, $p < 0.001$). Такой подъем отсутствовал у животных контрольной группы (рис. 1*А*; $F_{(8, 48)} = 0.43$, $p = 0.81$). Межгрупповое сравнение показало, что вызванный пребыванием в камере Б подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК у животных экспериментальной группы 1 был достоверно выше, чем уровень серотонина у крыс контрольной группы в ходе соответствующего контрольного теста ($F_{(8, 135)} = 4.7$, $p < 0.001$).

Пребывание в дифференцировочной камере Б животных экспериментальной группы 2, подвергнутых на этапе обучения введению флуоксетина в мПК, тоже приводило к подъему уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно соб-

ственного фона перед тестом (рис. 1*A*; $F_{(8, 48)} = 10.0$, $p < 0.001$). Такой подъем был выше уровня серотонина крыс контрольной группы (рис. 1*A*; $F_{(8, 108)} = 5.5$, $p < 0.001$), но, по данным двухфакторного дисперсионного анализа, он не отличался значимо от роста этого показателя в ходе данного теста у крыс экспериментальной группы 1, не подвергавшихся во время обучения введению флуоксетина в мПК (рис. 1*A*; $F_{(8, 135)} = 0.58$, $p = 0.80$).

Пребывание крыс экспериментальной группы 1 в условнорефлекторной камере А, ранее сочетавшейся с болевым раздражением, на этапе тестирования сопровождалось увеличением уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно фонового уровня перед тестом (рис. 1*B*; $F_{(6, 54)} = 5.8$, $p < 0.001$). Это увеличение уровня серотонина было достоверным относительно данного показателя животных контрольной группы (рис. 1*B*; $F_{(6, 105)} = 3.0$, $p = 0.009$), у которых не было обнаружено статистически значимых изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе соответствующего контрольного теста (рис. 1*B*; $F_{(6, 36)} = 1.3$, $p = 0.30$).

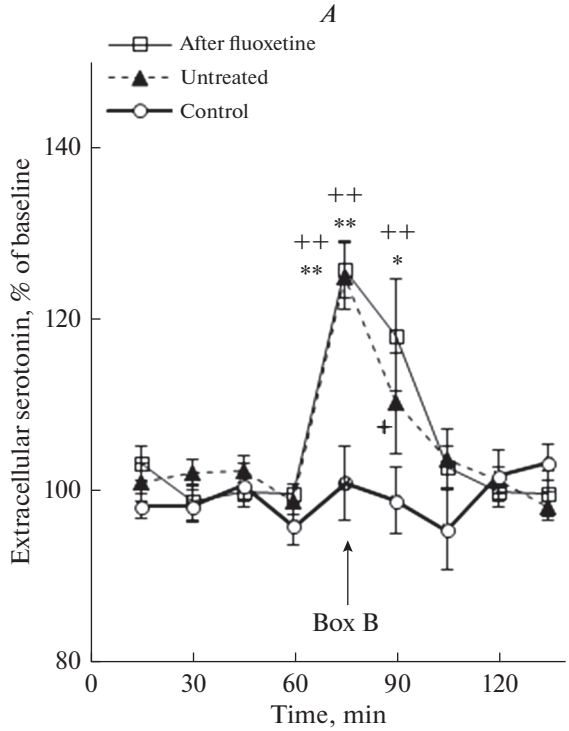
У животных экспериментальной группы 2, подвергавшихся введению флуоксетина в мПК во время обучения, на этапе тестирования был зарегистрирован статистически значимый подъем уровня внеклеточного серотонина в этой области во время пребывания в условнорефлекторной камере А относительно фонового уровня (рис. 1*B*; $F_{(6, 36)} = 9.9$, $p < 0.001$). Этот подъем был также достоверен относительно уровня серотонина в ходе соответствующего контрольного теста (рис. 1*B*; $F_{(6, 84)} = 5.0$, $p < 0.001$). Однако по данным двухфакторного дисперсионного анализа он не отличался от изменений уровня внеклеточного серотонина в ходе этого теста у крыс экспериментальной группы 1, не подвергнутых во время обучения введению флуоксетина (рис. 1*B*; $F_{(6, 111)} = 0.15$, $p = 0.99$).

Анализ поведения животных на этапе тестирования показал, что крысы экспериментальной группы 2 (с введением флуоксетина в мПК во время выработки УРС) характеризовались большей длительностью замирания в безопасной дифференцировочной камере Б (показатель генерализованного страха обстановки) по сравнению с крысами экспериментальной группы 1, не подвергавшихся введению флуоксетина во время выработки УРС (рис. 2; $t = 2.5$, $p = 0.02$). При этом замирание животных обеих экспериментальных групп в камере Б было статистически значимо выше, чем уровень неподвижности крыс контрольной группы в ходе соответствующего контрольного теста ($t = 4.5$, $p < 0.001$ и $t = 8.4$, $p < 0.001$ для крыс экспериментальных групп 1 и 2 соответственно).

Крысы экспериментальных групп 1 и 2 (с введением и без введения флуоксетина в мПК во время обучения) не различались между собой по замиранию в условнорефлекторной камере А (рис. 2; $t = 0.68$, $p = 0.50$), что свидетельствует об одинаковом уровне проявлений у них условнорефлекторного страха обстановки. При этом длительность замирания во время пребывания в камере А у животных обеих экспериментальных групп статистически значимо превосходила уровень неподвижности животных контрольной группы ($t = 3.9$, $p = 0.002$ и $t = 3.3$, $p = 0.004$ для крыс экспериментальных групп 1 и 2 соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Серотониновая система вовлечена в регуляцию многих физиологических процессов в норме и вносит вклад в их нарушение при психопатологии [16]. Одной из ее важных функций является контроль эмоциональных реакций, включая формирование, проявления и угашение условнорефлекторного страха [17]. Кроме того, накапливаются данные о роли серотонина в процессах генерализации страха [9, 13, 18, 19]. В частности, установлено, что мыши с генным нокаутом 5HT1A-рецепто-


A
After fluoxetine
Untreated
Control
Extracellular serotonin, % of baseline
140
120
100
80
0
30
60
90
120
Time, min
++
**
++
**
++
*
+
Box B

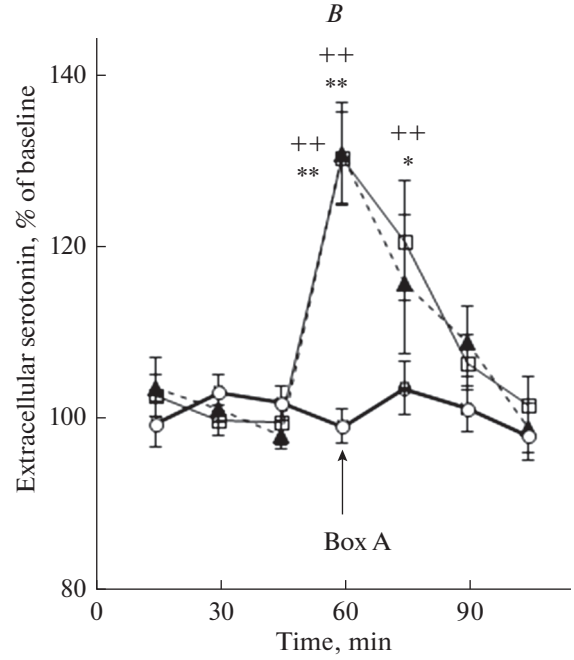

B
Extracellular serotonin, % of baseline
140
120
100
80
0
30
60
90
Time, min
++
**
++
**
++
*
Box A

Рис. 1. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызванные пребыванием (*A*) – в дифференцировочной камере Б (Box B) и (*B*) – в камере А (Box A), ранее сочетавшейся с электрокожным раздражением, крыс, подвергавшихся (After fluoxetine) и не подвергавшихся (Untreated) во время выработки УРС введению в мПК 1 мкМ флуоксетина, а также крыс контрольной группы (Control). По оси абсцисс – время, мин; по оси ординат – уровень серотонина, % к фону; разброс на графиках – ошибка среднего; стрелка – начало теста; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ при сравнении с фоном; + $p < 0.01$; ++ $p < 0.001$ – при сравнении с контрольной группой.

Fig. 1 Changes in extracellular serotonin levels in the mPFC on exposure to (*A*) – differentiation box B, (Box B) and (*B*) – to box A (Box A), previously paired with foothock, in rats subjected to (After fluoxetine) and not subjected to (Untreated) the intra-mPFC fluoxetine infusion (1μM) during the conditioned fear response acquisition, as well as in control rats (Control). The axis x – time, min; the axis y – extracellular serotonin level, % of baseline. The deviation in the curves is a standard error of measurements. Arrows – the beginning of the tests. *$p < 0.01$; ** $p < 0.001$ – compared with basal levels; + $p < 0.01$; ++ $p < 0.001$ – compared with the control group.

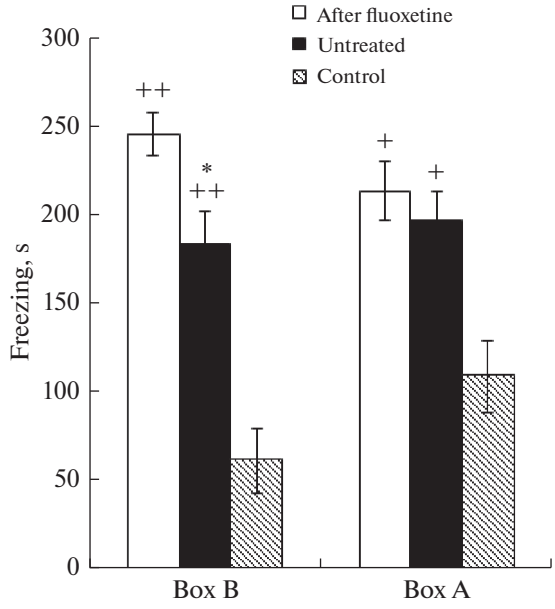


Рис. 2. Замирание (s) в камере Б (Box B) и в камере А (Box A) животных, подвергавшихся (After fluoxetine) и не подвергавшихся (Untreated) во время выработки УРС введению в мПК 1 мкМ флуоксетина, а также крыс контрольной группы (Control). + $p < 0.01$; ++ $p < 0.001$ при сравнении с контрольной группой; * $p < 0.05$ при сравнении с крысами после введений флуоксетина.

Fig. 2. Time spent freezing (s) in Box B (Box B) and in box A (Box A) of animals previously exposed (After fluoxetine) and not exposed (Untreated) to the intra-mPFC fluoxetine infusion (1μM) during the conditioned fear response acquisition, as well as in control rats (Control). + $p < 0.01$; ++ $p < 0.001$ – compared with the control group; * $p < 0.05$ – compared with the rats after fluoxetine infusion.

ров серотонина характеризуются повышенным уровнем замирания (показатель страха) в безопасной камере по сравнению с животными дикого типа [17], что свидетельствует об участии серотониновой системы целого мозга в генерализации страха обстановки. Наши прежние данные, приведенные во введении, позволяют предположить, что серотониновая система мПК может вносить вклад в этот процесс, поскольку уровень ее эндогенной активации во время выработки УРС, оцениваемый по уровню внеклеточного серотонина в мПК, коррелирует с выраженностью последующей генерализации страха обстановки [13]. Результаты настоящего исследования поддерживают это предположение, демонстрируя, что фармакологическая стимуляция серотониновой системы мПК во время выработки УРС введением в мПК флуоксетина, значительно увеличивающим, по нашим прежним данным [9], уровень внеклеточного серотонина в этой области, приводит впоследствии к увеличению длительности замирания животных в безопасной дифференцировочной камере Б, но не влияет на замирание в потенциально опасной условнорефлекторной камере А. Эти ранее неизвестные данные свидетельствуют, что не только высокая эндогенная активность серотониновой системы мПК [13], но и ее фармакологическая стимуляция во время выработки УРС усиливают будущую генерализацию обстановочного компонента этой условнорефлекторной реакции.

Недавно с использованием аналогичного методического подхода мы установили, что введение в мПК во время выработки УРС флуоксетина в такой же дозе увеличивает на этапе тестирования замирание животных на звуковой дифференцировочный сигнал, не ассоциируемый с болевым раздражением, но не влияет на замирание животных на звуковой условный сигнал, ранее сочетавшийся с болевым раздражением [9]. Рассмотренные вместе эти данные, во-первых, позволяют заключить, что при формировании страха активация серотонинергического входа ПК может быть значимым фактором, регулирующим степень будущей генерализации различных его компонентов – страха обстановки и страха, запускаемого звуковыми сигналами опасности Во-вторых, они показывают, что такая серотониновая регуляция селективно направлена на генерализацию формирующегося страха, но не затрагивает формирование специализированного страха обстановки (настоящая работа) и страха, вызываемого звуковыми сигналами опасности [9]. Показанная избирательность действия флуоксетина в мПК по отношению к процессам генерализации страха свидетельствует, что отдаленные эффекты флуоксетина на проявления генерализованного страха, по всей видимости, не связаны с изменением под действием препарата общей подвижности животных или их способности замирать. С учетом сведений о роли серотонина в мПК в механизмах синаптической пластичности [20, 21] можно предположить, что регулируемые серотониновой активацией пластические перестройки в мПК в ходе выработки УРС способствуют формированию и/или консолидации генерализованного страха.

Следует подчеркнуть, что участие мПК в генерализации условнорефлекторного страха обстановки и условнорефлекторного страха, вызываемого звуковыми сигналами опасности, в литературе связывают с разными нейрофизиологическими механизмами, базирующимися соответственно на взаимодействии мПК и гиппокампальной формации [2, 10] и мПК и амигдалы [22]. Результаты этой и предыдущей [9] наших работ, приведенные выше, позволяют заключить, что серотониновый вход мПК однонаправленно регулирует оба эти процесса, что, возможно, обеспечивает целостность поведенческого ответа в опасных ситуациях.

Данные литературы свидетельствуют, что проявления страха во время пребывания в камере, ассоциируемой с неизбегаемым болевым раздражением, сопровождаются выбросом серотонина в мПК [23], аналогичным выбросу серотонина, вызываемому самим болевым раздражением [24]. Результаты настоящего исследования подтверждают и расширяют этот вывод, впервые демонстрируя, что при

генерализации страха не только опасная, но и заведомо безопасная обстановка может вызывать сопровождаемый проявлениями страха выброс серотонина в мПК. Такие изменения отсутствуют у животных контрольной группы (те же процедуры, но без электрокожного раздражения в первый день экспериментов). То есть, они не связаны с активационным стрессом, вызванным пересадкой животного и, на наш взгляд, являются отражением генерализации страха, проявляющейся не только на поведенческом (замирание), но и на нейрохимическом (выброс серотонина в мПК) уровнях.

Функциональную роль выброса серотонина в мПК, запускаемого обстановочными сигналами опасности, предположительно, связывают с регуляцией замирания животных в ходе этого теста [23], что подтверждают результаты недавних исследований, проведенных с использованием микроиньекций в мПК лигандов рецепторов серотонина [25, 26]. Значение показанной в работе активации серотониновой системы мПК для проявлений генерализованного страха обстановки еще предстоит выяснить. Но следует подчеркнуть, что в настоящей работе мы не обнаружили видимой взаимосвязи между величиной подъема уровня внеклеточного серотонина в мПК во время пребывания в безопасной камере Б и выраженностью проявлений страха в ходе этого теста. А именно, усиление замирания в камере Б крыс экспериментальной группы 2 (ранее подвергавшихся введению флуоксетина в мПК) не сопровождалось дополнительными изменениями выброса серотонина по сравнению с этим показателем животных экспериментальной группы 1. Нужны дальнейшие исследования с использованием воздействий на серотониновую систему мПК на этапе тестирования, чтобы разобраться в этом вопросе.

Таким образом, полученные в работе новые данные свидетельствуют о том, что важной предпосылкой формирования генерализованного страха обстановки является активация серотониновой системы мПК в ходе формирования условнорефлекторного страха. Кроме того, они позволяют предположить, что усиление активности серотониновой системы мПК безопасными обстановочными стимулами может быть одним из нейрохимических проявлений генерализованного страха обстановки. Результаты вносят вклад в понимание роли серотонин-зависимых механизмов мПК в процессах генерализации страха обстановки.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-04-00449) и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 63).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Greenberg T., Carlson J.M., Cha J., Hajcak G., Mujica-Parodi L.R.* Ventromedial prefrontal cortex reactivity is altered in generalized anxiety disorder during fear generalization. Depress. Anxiet. 30(3): 242–250. 2013.
https://doi.org/10.1002/da.22016
2. *Rozeske R.R., Valerio S., Chaudun F., Herry C.* Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. Genes Brain Behav. 14(1): 22-36. 2015.
https://doi.org/10.1111/gbb.12181
3. *Corches A., Hiroto A., Bailey T.W., Speigel J.H., Pastore J., Mayford M., Korzus E.* Differential fear conditioning generates prefrontal neural ensembles of safety signals. Behav. Brain Res. 360: 169–184. 2019.
https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.042
4. *Dunsmoor J.E., Kroes M.C., Braren S.H., Phelps E.A.* Threat intensity widens fear generalization gradients. Behav. Neurosci. 131(2): 168–175. 2017.
https://doi.org/10.1037/bne0000186

5. *Jovanovic T., Kazama A., Bachevalier J., Davis M.* Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. Neuropharmacology. 62(2): 695–704. 2012.
https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.02.023
6. *Pitman R.K., Rasmusson A.M., Koenen K.C., Shin L.M., Orr S.P., Gilbertson M.W., Milad M.R., Liberzon I.* Biological studies of post-traumatic stress disorder. Nature Rev. Neurosci. 13(11): 769–787. 2012.
https://doi.org/10.1038/nrn3339
7. *Kaczkurkin A.N., Burton P.C., Chazin S.M., Adrienne B., Manbecka A.B., Espensen-Sturges T., Cooper S.E., Sponheim S.R., Lissek S.* Neural substrates of overgeneralized conditioned fear in PTSD. Am. J. Psychiatry. 174(2): 125–134. 2017.
https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.15121549
8. *Morey R.A., Dunsmoor J.E., Haswell C.C., Brown V.M., Vora A., Weiner J., Stjepanovic D., Wagner H.R., LaBar K.S.* Transl. Psychiatry. Fear learning circuitry is biased toward generalization of fear associations in posttraumatic stress disorder. Transl. Psychiatry. 5(12): e700. 2015.
https://doi.org/10.1038/tp.2015.19
9. *Саульская Н.Б., Марчук О.Э.* Торможение обратного захвата серотонина в медиальной префронтальной коре во время выработки условнорефлекторной реакции страха способствует формированию генерализованного страха. Журн. высш. нервн. деят. 69(3): 343–353. 2019. [*Saulskaya N.B., Marchuk O.E.* Inhibition of serotonin reuptake in the medial prefrontal cortex during conditioned fear response elaboration promotes generalized fear formation. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. 69(3): 343–353. 2019. (In Russ)].
https://doi.org/10.1134/S0044467719030134
10. *Xu W., Sudhof T.C.* A neural circuit for memory specificity and generalization. Science. 339(6125): 1290–1295. 2013.
https://doi.org/10.1126/science.1229534
11. *Zelikowsky M., Bissiere S., Hast T.A., Bennett R.Z., Abdipranoto A., Vissel B., Fanselow M.S.* Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110(24): 9938–9943. 2013.
https://doi.org/10.1073/pnas.1301691110
12. *Liberzon I., Abelson J.L.* Context Processing and the Neurobiology of Post-Traumatic Stress Disorder. Neuron. 92 (1): 14–30. 2016.
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.039
13. *Саульская Н.Б., Марчук О.Э.* Активность серотониновой системы префронтальной коры мозга у крыс с высокой и низкой генерализацией страха обстановки. Рос. физиол. журн. 104(4): 466–476. 2018. [*Saulskaya N.B., Marchuk O.E.* Serotonergic activity of the brain prefrontal cortex in rats with high and low contextual fear generalization. Russ. J. Physiol. 104(4): 466–476. 2018. (In Russ)].
14. *Саульская Н.Б., Судоргина П.В.* Активность нитрергической системы медиальной префронтальной коры крыс с высокой и низкой генерализацией условнорефлекторной реакции страха. Журн. высш. нервн. деят. 65(3): 372–381. 2015. [*Saulskaya N.B., Sudorgina P.V.* Nitrergic Activity of the Medial Prefrontal Cortex in Rats with High and Low Conditioned Fear Generalization. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. 65(3): 372–381. 2015. (In Russ)].
https://doi.org/10.7868/S0044467715030090
15. *Saulskaya N.B., Fofonova N.V.* Effects of N-methyl-D-aspartate on extracellular citrulline level in the rat nucleus accumbens. Neurosi. Letters. 407(1): 91–95. 2006.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.010
16. *De Deurwaerdere P., Di Giovanni G.* Serotonin in Health and Disease. Int. J. Mol. Sci. 21(10): 3500. 2020.
https://doi.org/10.3390/ijms21103500
17. *Bauer E.P.* Serotonin in fear conditioning processes. Behav. Brain Res. 277: 68–77. 2015.
https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.028
18. *Klemenhagen K.C., Gordon J.A., David D.J., Hen R., Gross C.T.* Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. Neuropsychopharmacology. 31(1): 101–111. 2006.
19. *Pedraza L.K., Sierra R.O., Giachero M., Nones-Sauza W., Lotz F.N., de Oliveira Alvares L.* Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction by remodeling hippocampal dendritic spines and slowing down system consolidation. Translational Psychiatry. 9(1): 53. 2019.
https://doi.org/10.1038/s41398-019-0371-3
20. *Meunier C.N.J., Amar M., Lanfumey L., Hamon M., Fossier P.* 5-HT1A receptors direct the orientation of plasticity in layer 5 pyramidal neurons of the mouse prefrontal cortex. Neuropharmacology. 71: 37–45. 2013.
https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.003
21. *Meunier C.N.J., Callebert J., Cancela J.M.* Effect of dopamine D1 receptors on plasticity is dependent of serotoninergic 5-HT1A receptors in L5-pyramidal neurons of the prefrontal cortex.

Plos One. 10(3): e0120286. 2015.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120286

22. *Likhtik E., Stujenske J.M., Topiwala M. A., Harris A.Z., Gordon J.A.* Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. Nat. Neurosci. 17(1): 106–113. 2014.
https://doi.org/10.1038/nn.3582

23. *Hashimoto S., Inoue T., Koyama T.* Effect of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. Eur. J. Pharmacol. 378(1): 23–30. 1999.
https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00441-0

24. *Bland S.T., Hargrave D., Pepin J.L., Amat J., Watkins L., Maier S.* Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. Neuropsychopharmacology. 28(9): 1589–1596. 2003.
https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300206

25. *Almada R.C., Coimbra N.C., Brandao M.L.* Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of Contextual fear: intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. Neuroscience. 284 (11): 988–997. 2015.
https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.001

26. *Leon L.A., Castro-Gomes V., Zarate-Guerrero S., Corredor K., Mello Crus A.P., Brandao M.L., Cardenas F.P., Landreira-Fernandez J.* Behavioral effects of systemic, infralimbic and prelimbic injections of a serotonin 5-HT 2A antagonist in carioca high- and low-conditioned freezing rats. Front. Behav. Neurosci. 11: 117. 2017.
https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00117

Contextual Fear Generalization Depends on the Activity of the Medial Prefrontal Cortex Serotonergic System

N. B. Saulskaya[a], * and O. E. Marchuk[a]

[a] *Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

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

The medial prefrontal cortex (mPFC) is involved in the regulation of fear generalization. We have previously shown that generalized fear formation to auditory cues is under the control of the mPFC serotonin system, as its pharmacological activation during a conditioned fear response acquisition (CFR – a fear model) enhances fear expression to safe auditory stimuli during testing. The aim of this work was to find out whether the mPFC serotonin system is involved in the contextual fear generalization. Using in vivo intracranial microdialysis in Sprague–Dawley rats, it was shown that placing animals in a potentially dangerous box A, in which they had previously acquired CFR (the paired presentation of a conditioned cue and inescapable footshock) was accompanied by an increase in the mPFC extracellular serotonin level and caused animals animals' freezing (a contextual fear measure). Placing the same animals in a safe differentiation box B also led to the extracellular serotonin level rise in the mPFC and caused animals' freezing (a measure of contextual fear generalization). The intra-mPFC infusion of a selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine (1 μM) during the fear response elaboration enhanced, during testing, animals' freezing in differentiation box B but did not affect animals' freezing in box A. The fluoxetine administration during training did not change the testing-induced extracellular serotonin levels rise in the mPFC in boxes A and B. The data indicate that activation of the mPFC serotonin system during fear formation affects the degree of contextual fear generalization. In addition, they suggest that one of the neurochemical manifestations of contextual fear generalization may be an increased activity of the mPFC serotonin system in the safe environment.

Keywords: medial prefrontal cortex, in vivo intracerebral microdialysis, serotonin release, conditioned fear response, fluoxetine, contextual fear generalization

ЦИТИРОВАТЬ:

Саульская Н.Б., Марчук О.Э. Генерализация страха обстановки зависит от активности серотониновой системы медиальной префронтальной коры. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1541–1552.

DOI: 10.31857/S0869813920120080

TO CITE THIS ARTICLE:

Saulskaya N.B., Marchuk O.E. Contextual Fear Generalization Depends on the Activity of the Medial Prefrontal Cortex Serotonergic System. Russian Journal of Physiology. 106(12): 1541–1552.

DOI: 10.31857/S0869813920120080

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1553–1563

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ НЕФРЭКТОМИИ НА РЕАКТИВНОСТЬ АРТЕРИЙ КРЫС ЛИНИИ WISTAR-KYOTO

© 2020 г. В. Н. Ярцев[1, *], Г. Т. Иванова[1], Г. И. Лобов[1]

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

Поступила в редакцию 07.09.2020 г.
После доработки 25.09.2020 г.
Принята к публикации 05.10.2020 г.

В опытах на сегментах передней брыжеечной (ПБА) и внутренней сонной артерии (ВСА) крыс линии Wistar-Kyoto изучалось влияние нефрэктомии как модели хронической болезни почек (ХБП) на констрикторные и дилататорные свойства этих артерий в изометрическом режиме. Нефрэктомию осуществляли посредством удаления 5/6 почечной ткани крыс в возрасте 3-х месяцев. Дилатацию сосудов, пресокращенных фенилэфрином, вызывали ацетилхолином или нитропруссидом натрия в отсутствие и на фоне действия блокаторов калиевых каналов (тетраэтиламмония или глибенкламида) либо ингибитора гуанилатциклазы – метиленового синего. Было обнаружено, что нефрэктомия увеличивает сократительную реакцию ПБА, но не ВСА на фенилэфрин. Реакция ПБА и ВСА на ацетилхолин в большинстве случаев имела дилататорную и констрикторную фазу. Дилататорная фаза обеих артерий крыс после нефрэктомии не отличалась по величине от контрольных в отсутствие и на фоне действия блокаторов и ингибитора, но снижалась под действием тетраэтиламмония (у контрольных и нефрэктомированных крыс) и метиленового синего (у контрольных крыс). У нефрэктомированных крыс величина вызванной ацетилхолином констрикции в условиях отсутствия блокаторов была больше, чем у контрольных животных только для ПБА, а на фоне действия тетраэтиламмония – для обеих артерий. У нефрэктомированных крыс в отличие от контрольных в опытах на ПБА глибенкламид снижал вызванную ацетилхолином констрикцию, а в опытах на ВСА у этих крыс в отличие от контрольных животных не оказывал влияния метиленовый синий. Делается заключение, что ХБП может усиливать эндотелий-зависимые и -независимые констрикторные реакции артерий и изменять сигнальные пути этих реакций, которые могут отличаться у артерий разных типов.

Ключевые слова: передняя брыжеечная артерия, внутренняя сонная артерия, крысы линии Wistar Kyoto, нефрэктомия, фенилэфрин, ацетилхолин

DOI: 10.31857/S0869813920120092

Хроническая болезнь почек (ХБП) широко распространена. По данным Национального почечного фонда США, каждый десятый житель на планете страдает ХБП (если учитывать все стадии: от I до V) [1]. Пациенты с ХБП подвержены повышенному риску сердечно-сосудистых заболеваний – заболеваемость в 20–35 раз, а смертность в 10–20 раз выше, чем в общей популяции [2]. Большинство пациентов с ХБП умирают от болезней сердечно-сосудистой системы до развития терминальной стадии почечной недостаточности: это касается не только пациентов с артериальной гипертензией, сахарным диабетом и гиперхолестеринемией, но и молодых

людей, а также детей с ХБП, хотя у этих пациентов отсутствуют сопутствующие заболевания [3]. При ХБП 4–5-й стадии в плазме крови накапливается большая группа веществ, объединяемых общим названием “уремические токсины”, число которых приближается к сотне [4]. Циркулирующие с кровью уремические токсины оказывают повреждающее действие, в первую очередь, на эндотелий и гладкомышечные клетки сосудов. Имеются данные о том, что уремические токсины способствуют фенотипическому изменению сосудистых гладкомышечных клеток, что приводит к экспрессии коллагена I типа и последующему ремоделированию внеклеточного матрикса в стенке сосудов [5]. В процессе кальцификации происходит остеогенная дифференцировка гладкомышечных клеток сосудов: они перестают выполнять сократительную функцию и начинают синтезировать белки, характерные для остеобластов [6]. Кальцификация сосудистой стенки проявляется в виде отложения фосфата кальция между гладкомышечными клетками и элементами соединительной ткани (артериосклероз) и является основной причиной повышения жесткости стенки артерий.

Сердечно-сосудистые заболевания среди пациентов с ХБП связаны не только с сосудистой кальцификацией, но и с эндотелиальной дисфункцией, представляющей собой системный процесс, включающий ослабление эндотелий-зависимой вазодилатации и сопровождающийся сужением сосудов и структурной перестройкой микроциркуляторного русла [7]. Было показано, что асимметричный диметиларгинин (один из важнейших уремических токсинов) подавляет продукцию эндотелием NO, это приводит к нарушениям регуляции сосудистого тонуса и провоцирует длительные тонические сокращения гладкомышечных клеток сосудов, способствуя развитию артериальной гипертензии [8]. Дисфункция эндотелия при ХБП развивается также в результате окислительного стресса и хронического воспаления [9].

Учитывая значимость ХБП и ограниченные возможности проведения исследований на человеке, было разработано несколько моделей ХБП на животных, что позволило более детально изучить повреждение стенки сосудов при этой патологии. В частности, было показано, что в сосудистой стенке при ХБП выявляется воспалительный процесс, подавлена функция эндотелиальной NO-синтазы и повышена активность индуцибельной NO-синтазы, а в гладкомышечных клетках увеличена концентрация цитоплазматического Ca^{2+} из-за ингибирования уремическими токсинами Ca^{2+}-АТФ-азы. Анализ публикаций показывает, что в этой области было выполнено значительное количество исследований на аорте и сосудах микроциркуляторного русла [10, 11]. Работ на мелких и средних артериях значительно меньше.

В связи с этим основной целью настоящего исследования было изучение влияния ХБП на функции артерий, обеспечивающих кровоснабжение органов с различным уровнем метаболизма и различным строением стенки: исследование проводилось на передней брыжеечной артерии (ПБА), которая относится к артериям мышечно-эластического типа с преобладанием гладкомышечных клеток, и на внутренней сонной артерии (ВСА), в стенке которой преобладают соединительнотканные компоненты. Для этой цели нами была выбрана модель ХБП, вызванная нефрэктомией (удаление 5/6 почечной ткани), поскольку она гарантированно приводит к снижению клубочковой фильтрации и метаболическим нарушениям, характерным для пациентов с уремией.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из ЦКП Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной Программой ФАНО России по сохранению и развитию биоресурсных коллекций.

Опыты проводили (в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями комиссии по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН) на самцах крыс линии Wistar-Kyoto через 3 мес. после нефрэктомии (n = 12, артериальное давление (АД) 127.2 ± 2.2 мм рт. ст.) и ложнооперированных контрольных (n = 12, АД 127.1 ± 1.8 мм рт. ст.) животных массой 250–350 г. АД измеряли манжеточным методом на хвосте, используя электроманометр фирмы ELEMA (Швеция). Экспериментальную модель ХБП создавали за счет резекции 5/6 массы почечной ткани у крыс в возрасте 3-х месяцев по описанной ранее методике [11]. Как нами было показано ранее [11], через 4 мес. после такой резекции почечной ткани содержание мочевины в сыворотке крови у крыс увеличивалось в среднем до 20.1 ± 2.6 ммоль/л, у контрольных животных оно составляло 4.9 ± 0.6 ммоль/л, $p < 0.001$). Контролем служили ложнооперированные крысы, которые подвергались аналогичному оперативному вмешательству, но без удаления почечной ткани. Эвтаназию животных осуществляли посредством эфирного наркоза. После эвтаназии отпрепаровывали левую ВСА, а также ПБА. От каждой из этих артерий отрезали кольцевой участок длиной 2 мм. Артериальный сегмент помещали на две вольфрамовые иголочки (диаметром 70 мкм каждая), одна из которых была соединена со штоком погружателя микроэлектродов, а вторая – с механотроном 6МХ1С, сигнал от которого, отражающий изменение натяжения в стенке сегмента, усиливался и поступал на АЦП S-Recorder-L (ADSlab, Россия), а далее на компьютер для обработки в программе S-Recorder (ADSlab, Россия). Иголочки с кольцевым участком помещали в проточную термостатируемую (37°C) ванночку объемом 10 мл, заполненную бикарбонатным раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl 115, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.6, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, глюкоза 10. pH раствора доводили до значения 7.4 и контролировали в течение всего эксперимента, поддерживая это значение путем пропускания через раствор соответствующего количества CO_2 или комнатного воздуха. После погружения в раствор иголочки миографа ступенчато разводили до значения натяжения, при котором наблюдался максимальный ответ сосудистого сегмента на стимуляцию электрическим полем (30 В, 3 мс, в течение 3 с) с частотой 10 Гц. Электростимуляция осуществлялась с помощью двух платиновых электродов, расположенных на расстоянии 2 мм от сосудистого сегмента. После адаптации препарата в течение 30 мин начинали регистрацию натяжения стенки сосуда. Для оценки дилататорной способности сосуда использовали ацетилхолин хлорид (Sigma-Aldrich, США) 10^{-5} М или нитропруссид натрия (ICN Biomedicals, США) 10^{-6} М на фоне пресокращения фенилэфрином (Sigma-Aldrich, США) 10^{-5} М. Дилатацию выражали в процентном отношении к констрикции, вызванной фенилэфрином. С целью оценки участия Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов большой проводимости, АТФ-чувствительных K^+-каналов и растворимой гуанилатциклазы в сосудистых реакциях в ванночку вводили соответствующие блокаторы: тетраэтиламмоний хлорид (Вектон, Россия) 10^{-3} М, глибенкламид (Sigma-Aldrich, США) 10^{-5} М или ингибитор растворимой гуанилатциклазы – метиленовый синий (Вектон, Россия) 10^{-5} М. Через 15 мин после начала действия блокатора или ингибитора вводили фенилэфрин с последующим введением ацетилхолина и нитропруссида натрия. Маточный раствор глибенкламида готовили на основе диметилсульфоксида (Вектон, Россия), используемого для этой цели в экспериментах на изолированных сосудах [12]. Концентрация диметилсульфоксида в ванночке с сосудистым сегментом не превышала 0.1%. Маточные растворы всех остальных используемых веществ готовили на основе дистиллированной воды.

При статистической обработке результатов использовали программу Statistica v.12. Полученные данные представляли в виде среднего значения ± стандартная ошибка

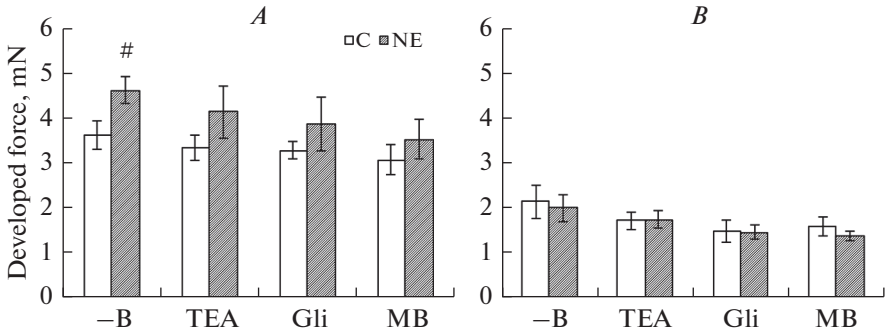


Рис. 1. Сократительная реакция на фенилэфрин (10^{-5} М) сегмента верхней брыжеечной (*A*) и внутренней сонной (*B*) артерии контрольных (C) и нефрэктомированных (NE) крыс в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора (–B) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA, 10^{-3} М), глибенкламида (Gli, 10^{-5} М) или метиленового синего (MB, 10^{-5} М). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. # $p < 0.05$ при сравнении с контролем (C).

Fig. 1. Contraction of the superior mesenteric artery (*A*) and internal carotid artery (*B*) rings of the control (C) and nefrectimized (NE) rats to phenylephrine (10^{-5} M) in the absence of the blockers and inhibitor (–B) and in the presence of tetraethylammonium (TEA, 10^{-3} M), glibenclamide (Gli, 10^{-5} M) or methylene blue (MB, 10^{-5} M). Data are presented as means ± SEM. # $p < 0.05$ versus control (C).

среднего. Достоверность отличий реакций сосудов нефрэктомированных и контрольных крыс в отсутствие и на фоне действия блокаторов и ингибитора в случае нормального распределения вариант определяли, применяя двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. В случае распределения вариант в выборке, отличном от нормального, при сравнении двух зависимых групп применяли критерий Уилкоксона, независимых – U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах, проведенных на ПБА контрольных и нефрэктомированных крыс, введение фенилэфрина вызывало сократительную реакцию, которая в среднем составляла 3.6 ± 0.3 и 4.6 ± 0.3 мН соответственно и была достоверно больше у крыс после нефрэктомии ($p < 0.05$). Какого-либо действия блокаторов и ингибитора на эту реакцию у крыс обеих групп обнаружено не было (рис. 1*A*). Величина сократительной реакции ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс была почти в 2 раза меньше, чем у ПБА, и в среднем в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора составляла 2.2 ± 0.4 и 2.0 ± 0.3 мН соответственно. Влияния нефрэктомии, блокаторов и ингибитора на данную реакцию у этой артерии не обнаружено (рис. 1*B*).

Пресокращенные фенилэфрином артерии в подавляющем большинстве случаев реагировали на введение ацетилхолина двухфазной реакцией, в которой дилататорная фаза ПБА контрольных и нефрэктомированных крыс составляла 43.5 ± 8.4 и 55.6 ± 11.8% соответственно. На фоне действия блокаторов и ингибитора достоверное изменение дилататорной фазы наблюдалось у сосудов контрольных крыс для тетраэтиламмония и метиленового синего, а у сосудов нефрэктомированных крыс только для тетраэтиламмония (рис. 2*A*). Какого-либо действия нефрэктомии на эту фазу реакции ни в отсутствие, ни при наличии блокаторов и ингибитора об-

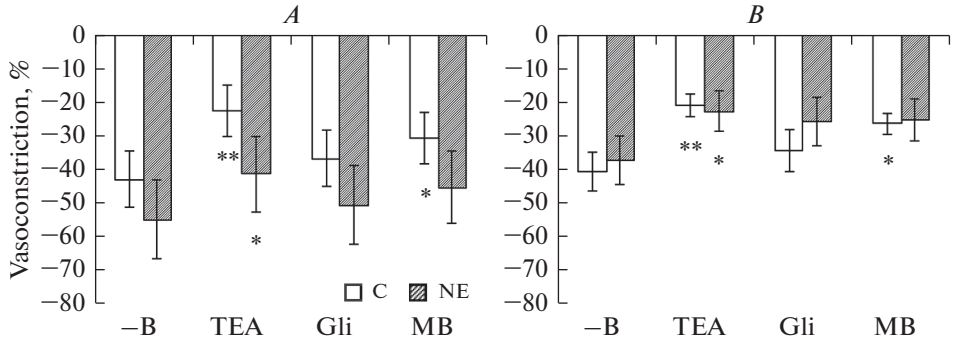


Рис. 2. Дилататорная реакция на ацетилхолин (10^{-5} М) пресокращенного фенилэфрином (10^{-5} М) сегмента верхней брыжеечной (*A*) и внутренней сонной (*B*) артерии контрольных (С) и нефрэктомированных (NE) крыс в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора (–В) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA, 10^{-3} М), глибенкламида (Gli, 10^{-5} М) или метиленового синего (MB, 10^{-5} М). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ при сравнении с (–В) соответствующей группы.

Fig. 2. Dilatation of the superior mesenteric artery (*A*) and internal carotid artery (*B*) rings of the control (C) and nefrectimized (NE) rats to acetylcholine (10^{-5} M) following precontraction by phenylephrine (10^{-5} M) in the absence of the blockers and inhibitor (–B) and in the presence of tetraethylammonium (TEA, 10^{-3} M), glibenclamide (Gli, 10^{-5} M) or methylene blue (MB, 10^{-5} M). Data are presented as means ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ versus (–B) of the corresponding group.

наружено не было. Сходные результаты были получены на ВСА (рис. 2*B*). Наиболее значительное уменьшение дилатации (примерно в два раза) наблюдалось на фоне действия тетраэтиламмония у сосудов контрольных крыс (с 43.5 ± 8.4 до 22.9 ± 7.6% у ПБА и с 40.9 ± 5.7 до 21.1 ± 3.3% у ВСА). Следует заметить, что сам тетраэтиламмоний вызывал сокращение сосудов, которое для ПБА контрольных и нефрэктомированных крыс составляло соответственно 4.6 ± 1.8 и 1.7 ± 0.8% ($p > 0.05$), а для ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс соответственно 16.5 ± 5.3 и 17.0 ± 3.2% ($p > 0.05$), т.е. не изменялось в результате нефрэктомии.

Констрикторная фаза реакции на ацетилхолин ПБА контрольных крыс составляла 6.0 ± 1.6% и не изменялась на фоне действия блокаторов и ингибитора, в то время как у нефрэктомированных крыс эта фаза в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора, а также в присутствии тетраэтиламмония была значительно и достоверно больше, составляя 27.5 ± 8.1 и 25.4 ± 8.0% соответственно и достоверно снижалась на фоне действия глибенкламида (рис. 3*A*). Вызванная ацетилхолином сократительная реакция ВСА контрольных крыс в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора была близка к полученной на ПБА (3.9 ± 1.0%) и достоверно снижалась на фоне действия тетраэтиламмония, глибенкламида и метиленового синего, составляя 0.3 ± 0.2, 0.1 ± 0.1 и 0.8 ± 0.4% соответственно (рис. 3*B*). Сходная картина снижения величины сократительной реакции ВСА на фоне действия блокаторов и ингибитора наблюдалась и для нефрэктомированных крыс (рис. 3*B*), однако степень этого снижения была меньше, в силу чего величина данной реакции у этих крыс на фоне действия тетраэтиламмония оказалась достоверно большей, чем у контрольных животных.

Дилататорная реакция ПБА контрольных и нефрэктомированных крыс, вызванная нитропруссидом натрия, в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора

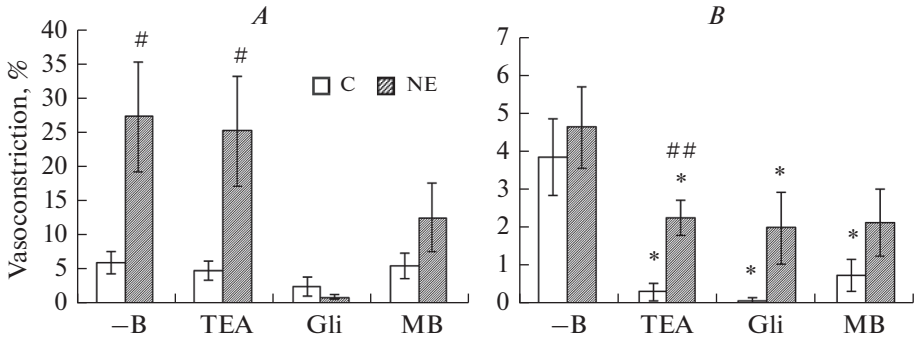


Рис. 3. Сократительная реакция на ацетилхолин (10^{-5} М) пресокращенного фенилэфрином (10^{-5} М) сегмента верхней брыжеечной (*A*) и внутренней сонной (*B*) артерии контрольных (C) и нефрэктомированных (NE) крыс в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора (−B) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA, 10^{-3} М), глибенкламида (Gli, 10^{-5} М) или метиленового синего (MB, 10^{-5} М). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ при сравнении с (−B) соответствующей группы; # $p < 0.05$; ## $p < 0.005$ при сравнении с контролем (C).

Fig. 3. Contraction of the superior mesenteric artery (*A*) and internal carotid artery (*B*) rings of the control (C) and nefrectimized (NE) rats to acetylcholine (10^{-5} M) following precontraction by phenylephrine (10^{-5} M) in the absence of the blockers and inhibitor (−B) and in the presence of tetraethylammonium (TEA, 10^{-3} M), glibenclamide (Gli, 10^{-5} M) or methylene blue (MB, 10^{-5} M). Data are presented as means ± SEM. * $p < 0.05$ versus (−B) of the corresponding group; # $p < 0.05$; ## $p < 0.005$ versus control (C).

была примерно одинаковой, составляя 88.8 ± 6.9 и 85.2 ± 8.1% соответственно, и достоверно не изменялась на фоне их действия (рис. 4*A*), в то время как у ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс эта реакция при наличии блокаторов, особенно глибенкламида, значительно возрастала: с 121.7 ± 48.6 и 105.1 ± 5.5% до 253.5 ± 6.8 и 170.0 ± 19.9% соответственно (рис. 4*B*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе было показано, что нефрэктомия увеличивает сократительную реакцию ПБА, но не ВСА на фенилэфрин. Как известно, ХБП у человека и нефрэктомия, являющаяся ее моделью на животных, вызывает изменение реактивности кровеносных сосудов [13–16], причем это изменение может быть разным у разных сосудов. Так, например, в опытах на аорте и хвостовой артерии крысы [17] после нефрэктомии величина сократительного ответа на фенилэфрин на аорте возрастала, а на хвостовой артерии снижалась. Отсутствие изменения реакции на фенилэфрин после нефрэктомии, показанное в наших опытах на ВСА, было отмечено и ранее на общей сонной артерии крысы [18]. Нами не было обнаружено угнетающего действия нефрэктомии на эндотелий-зависимую дилатацию, вызванную ацетилхолином, ни на ПБА, ни на ВСА. Аналогичные результаты были получены ранее другими авторами, в частности, на ПБА [19] и на хвостовой артерии крысы [17]. Однако в ряде работ было показано снижение эндотелий-зависимой дилатации после нефрэктомии. В частности, такое снижение наблюдалось на аорте [11, 14, 15] и общей сонной артерии крысы [18]. В нашем предыдущем исследовании на ПБА [11] нефрэктомия приводила к уменьшению расслабления этой артерии, вызванного ацетилхолином, однако, тогда опыты проводили на крысах другой линии (Wistar).

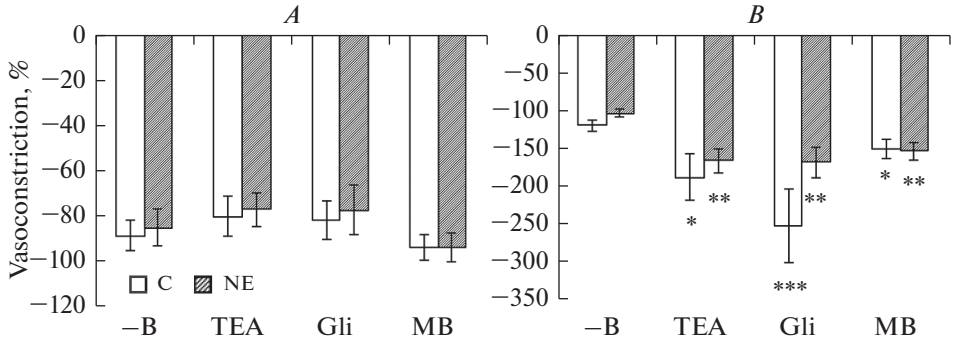


Рис. 4. Дилататорная реакция на нитропруссид (10^{-6} М) пресокращенного фенилэфрином (10^{-5} М) сегмента верхней брыжеечной (*A*) и внутренней сонной (*B*) артерии контрольных (C) и нефрэктомированных (NE) крыс в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора (–B) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA, 10^{-3} М), глибенкламида (Gli, 10^{-5} М) или метиленового синего (MB, 10^{-5} М). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ при сравнении с (–B) соответствующей группы.

Fig. 4. Dilatation of the superior mesenteric artery (*A*) and internal carotid artery (*B*) rings of the control (*C*) and nefrectimized (NE) rats to sodium nitroprusside (10^{-6} M) following precontraction by phenylephrine (10^{-5} M) in the absence of the blockers and inhibitor (–B) and in the presence of tetraethylammonium (TEA, 10^{-3} M), glibenclamide (Gli, 10^{-5} M) or methylene blue (MB, 10^{-5} M). Data are presented as means ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ versus (-B) of the corresponding group.

Как было показано в опытах на брыжеечной артерии мыши, влияние нефрэктомии на расслабление, вызванное ацетилхолином, может иметься, а может и отсутствовать в зависимости от генетической линии животных [16]. Кроме того, разница в результатах может объясняться тем, что в отличие от крыс линии Wistar, у которых нефрэктомия приводила к значительному повышению АД (165.0 ± 9.8 мм рт. ст. по сравнению с 127.2 ± 9.7 мм рт. ст. в контрольной группе, $p < 0.01$), в этом нашем исследовании на крысах линии Wistar-Kyoto нефрэктомия не вызывала изменения АД (127.7 ± 2.2 мм рт. ст. по сравнению с 127.1 ± 1.8 мм рт. ст. в контрольной группе, $p > 0.05$). Было показано, что нормализация АД с помощью терапии у крыс после нефрэктомии приводит к нормализации первоначально сниженной вазодилатации, вызванной ацетилхолином [17].

В целях выяснения участия в сосудодвигательных реакциях ПБА и ВСА Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов большой проводимости, АТФ-чувствительных K^+-каналов и растворимой гуанилатциклазы мы использовали соответствующие блокаторы и ингибиторы: тетраэтиламмоний, глибенкламид и метиленовый синий соответственно. В нашей работе было показано, что вызванная ацетилхолином дилатация ПБА и ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс существенно уменьшалась на фоне действия тетраэтиламмония, т.е. была в значительной степени обусловлена Ca^{2+}-активируемыми K^+-каналами большой проводимости. Аналогичные данные были получены нами ранее на ПБА крыс линии Wistar [11], а также другими авторами на общей сонной артерии крыс [20]. Причем, в указанной выше работе на сонной артерии, как и в нашем исследовании, не было обнаружено действия глибенкламида на дилатацию, вызванную ацетилхолином. Нами было показано угнетающее действие метиленового синего на вызванную ацетилхолином

дилатацию ПБА и ВСА контрольных, но не нефрэктомированных крыс, что может свидетельствовать о влиянии нефрэктомии на активность растворимой гуанилатциклазы в процессах эндотелий-зависимой дилатации этих артерий.

В наших опытах в подавляющем большинстве случаев отмечалась двухфазная реакция ПБА и ВСА на ацетилхолин, причем констрикторная фаза этой реакции сосудов нефрэктомированных крыс была значительно больше, чем у контрольных животных, как в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора (для ПБА), так и на фоне действия тетраэтиламмония (для ПБА и ВСА). Вызванная ацетилхолином эндотелий-зависимая вазоконстрикция, продемонстрированная на разных кровеносных сосудах [21–24], обусловлена стимуляцией мускариновых рецепторов эндотелия [21, 22]. Она устранялась блокадой циклооксигеназы [21–24], т.е. связана с синтезом простагландинов и опосредована ваниллоидными рецепторами TRPV4 эндотелия [23]. Полученные нами данные об усилении вызванной ацетилхолином вазоконстрикции ВСА крыс после нефрэктомии согласуются с данными, полученными ранее на церебральных артериях в экспериментах *in vivo* [24]. Сократительная реакция в наших опытах на ПБА контрольных крыс под действием блокаторов и ингибитора не изменялась, в то время как у нефрэктомированных крыс она значительно снижалась на фоне действия глибенкламида, что может свидетельствовать об участии АТФ-чувствительных K^+-каналов в повышенной сократимости этих сосудов после нефрэктомии. В опытах на ВСА использованные нами блокаторы и ингибитор в большей степени уменьшали констрикцию сосудов контрольных крыс, но наибольшая разница была отмечена на фоне действия тетраэтиламмония, что позволяет высказать предположение о меньшем участии Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов большой проводимости в этой констрикции данных сосудов нефрэктомированных крыс. Кроме того, метиленовый синий достоверно уменьшал констрикцию ВСА только у контрольных крыс, что может свидетельствовать о снижении активности растворимой гуанилатциклазы в этих артериях после нефрэктомии.

Нами не было обнаружено влияния нефрэктомии на эндотелий-независимую дилатацию, вызванную нитропруссидом натрия, ни на ПБА, ни на ВСА. Отсутствие влияния нефрэктомии на вазодилатацию, вызванную нитропруссидом натрия, было показано ранее в большинстве исследований. В частности, оно не отмечалось ни на аорте [14, 15, 17] и хвостовой артерии крысы [17], ни на брыжеечной [16, 19] и сонной артерии [18, 25], которые были использованы в наших опытах. Следует заметить, что в исследовании, проведенном на человеке, в условиях *in vivo* было отмечено уменьшение эндотелий-независимого расслабления от нитропруссида натрия при ХБП [13], это может объясняться видовой специфичностью. В наших экспериментах на ПБА блокаторы и ингибитор не оказывали действия на эту реакцию, в то время как на ВСА все они значительно ее усиливали у сосудов крыс обоих групп. Отсутствие уменьшения эндотелий-независимого расслабления от нитропруссида натрия на фоне действия глибенкламида и тетраэтиламмония, которое мы наблюдали на ПБА, было показано и другими авторами [12]. Следует заметить, что величина расслабления ВСА от нитропруссида натрия была значительно больше величины ее сокращения от фенилэфрина. Это было отмечено и в работе других авторов на сонной артерии, но взятой от другого животного – кролика [25]. Данный факт может свидетельствовать о наличии спонтанного тонуса сонной артерии, который, как показано в нашем исследовании, в значительной степени может сниматься NO в условиях блокады Ca^{2+}-активируемых и АТФ-чувствительных K^+-каналов, а также ингибирования растворимой гуанилатциклазы.

Обнаруженные нами различия действия нефрэктомии на сократительные свойства ПБА и ВСА могут быть связаны с различием в строении стенки этих артерий. Большее усиление констрикции у ПБА может объясняться преобладанием гладко-

мышечных клеток в стенке данной артерии. Кроме того, как показало наше исследование, у этих артерий различаются сигнальные пути, обеспечивающие эндотелий-зависимую констрикцию. Различие сигнальных путей кровеносных сосудов разных типов было показано и другими авторами, в частности, для аорты и хвостовой артерии крыс после нефрэктомии [17].

Итак, в нашем исследовании на сосудах крыс линии Wistar-Kyoto было показано, что нефрэктомия посредством удаления 5/6 почечной ткани приводит к увеличению сокращения ПБА в ответ на действие фенилэфрина и ацетилхолина, а ВСА – на ацетилхолин в присутствии тетраэтиламмония, что свидетельствует о меньшем участии Ca^{2+}-активируемых K^{+}-каналов большой проводимости в этой констрикции данных сосудов после нефрэктомии. Кроме того, после нефрэктомии исчезало угнетающее действие метиленового синего на вызванную ацетилхолином сократительную реакцию ВСА и дилататорную реакцию обеих артерий, указывающее на снижение активности растворимой гуанилатциклазы в этих артериях в результате нефрэктомии. Полученные данные доказывают, что хроническая болезнь почек может усиливать констрикторные реакции артерий и изменять сигнальные механизмы дилататорных и констрикторных реакций, причем эти изменения могут отличаться у артерий разных типов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-015-00047).

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Collins A.J., Foley R.N., Chavers B., Gilbertson D., Herzog C., Johansen K., Kasiske B., Kutner N., Liu J., St Peter W., Guo H., Gustafson S., Heubner B., Lamb K., Li S., Peng Y., Qiu Y., Roberts T., Skeans M., Snyd J.* United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States. Am. J. Kidney Dis. 59(1): 1–420. 2012.
2. *Liyanage T., Ninomiya T., Jha V., Neal B., Patrice H.M., Okpechi I., Zhao M., Lv J., Garg A.X., Knight J., Rodgers A., Gallagher M., Kotwal S., Cass A., Perkovic V.* Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. Lancet. 385(9981): 1975–1982. 2015.
3. *Mitsnefes M.M.* Cardiovascular complications of pediatric chronic kidney disease. Pediatr. Nephrol. 23(1): 27–39. 2008.
4. *Ito S., Yoshida M.* Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. Toxins (Basel). 6(2): 665–678. 2014.
5. *Bai Y., Zhang J., Xu J., Cui L., Zhang H., Zhang S.* Alteration of type I collagen in the radial artery of patients with endstage renal disease. Am. J. Med. Sci. 349(4): 292–297. 2015.
6. *Louvet L., Bazin D., Büchel J.* Characterisation of calcium phosphate crystals on calcified human aortic vascular smooth muscle cells and potential role of magnesium. PLoS One. 10(1): e0115342. 2015.
7. *Abularrage C.J., Sidawy A.N., Aidinian G., Singh N., Weiswasser J.M., Arora S.* Evaluation of the microcirculation in vascular disease. J. Vasc. Surg. 42: 574–581. 2005.
8. *Kimura K.* Methylarginies-induced endothelial dysfunction in chronic kidney disease. Yakugaku Zasshi. 132(4): 443–448. 2012.
9. *Townsend R.R.* Arterial stiffness and chronic kidney disease: lessons from the Chronic Renal Insufficiency Cohort study. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 24(1): 47–53. 2015.
10. *Лобов Г.И., Исачкина А.Н., Гурков А.С.* Особенности регуляции сосудов микроциркуляторного русла у пациентов с хронической болезнью почек, получающих лечение перитонеальным диализом. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 15(1): 65–72. 2016. [*Lobov G.I., Isachkina A.N., Gurkov A.S.* Features of microvasculature regulation in patients with chronic kidney disease on peritoneal dialysis. Regional Blood Circulation and Microcirculation. 15(1): 65–72. 2016. (In Russ)].
11. *Иванова Г.Т., Лобов Г.И., Береснева О.Н., Парастаева М.М.* Изменение реактивности сосудов крыс с экспериментальным уменьшением массы функционирующих нефронов. Нефрология. 23(4): 88–95. 2019. [*Ivanova G.T., Lobov G.I., Beresneva O.N., Parastaeva M.M.* Changes in the reactivity of vessels of rats with an experimental decrease in the mass of functioning nephrons. Nephrology. 23(4): 88–95. 2019. (In Russ)].

12. *Ohashi M., Faraci F., Heistad D.* Peroxynitrite hyperpolarizes smooth muscle and relaxes internal carotid artery in rabbit via ATP-sensitive K+ channels. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 289(5): H2244–H2250. 2005.
13. *Kopel T., Kaufman J., Hamburg N., Sampalis J., Vita J., Dember L.* Endothelium-dependent and -independent vascular function in advanced chronic kidney disease. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 12(10): 1588–1594. 2017.
14. *Zanetti M., Cappellari G., Barbetta D., Barbetta D., Semolic A., Barazzoni R.* Omega 3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial dysfunction in chronic renal failure: role of eNOS activation and of oxidative stress. Nutrients. 9(8): 895. 2017.
15. *Li T., Gua C., Wu B., Chen Y.* Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 495(2): 2071–2077. 2018.
16. *Hamzaoui M., Djerada Z., Brunel V., Mulder P., Richard V., Bellien J., Guerrot D.* 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice. Sci. Rep. 10(1): 1524. 2020.
17. *Spradley F., White J., Paulson W., Pollock D., Pollock J.* Differential regulation of nitric oxide synthase function in aorta and tail artery from 5/6 nephrectomized rats. Physiol. Rep. 1(6): e00145. 2013.
18. *Köhler R., Eichler I., Schönfelder H., Grgic I., Heinau P., Si H., Hoyer J.* Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca-activated K channels in uremic rats. Kidney Int. 67(6): 2280–2287. 2005.
19. *Nguy L., Nilsson H., Lundgren J., Johansson M., Teerlink T., Scheffer P., Guron G.* Vascular function in rats with adenine-induced chronic renal failure. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol. 302(12): R1426–R1435. 2012.
20. *Kamata K., Ohuchi K., Kirisawa H.* Altered endothelium-dependent and -independent hyperpolarization and endothelium-dependent relaxation in carotid arteries isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 362(1): 52–59. 2000.
21. *Baretella O., Xu A., Vanhoutte P.M.* Acidosis prevents and alkalosis augments endothelium-dependent contractions in mouse arteries. Pflugers Arch. 466(2): 295–305. 2014.
22. *Giang M., Papamatheakis D.G., Nguyen D., Paez R., Johnston C.B., Kim J., Brunnell A., Blood Q., Goyal R., Longo L.D., Wilson S.M.* Muscarinic receptor activation affects pulmonary artery contractility in sheep: The impact of maturation and chronic hypoxia on endothelium-dependent and endothelium-independent function. High Alt. Med. Biol. 17(2): 122–132. 2016.
23. *Zhang P., Sun C., Li H., Tang C., Kan H., Yang Z., Mao A., Ma X.* TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) mediates endothelium-dependent contractions in the aortas of hypertensive mice. Hypertension. 71(1): 134–142. 2018.
24. *Лобов Г.И., Соколова И.Б.* Роль NO и H2S в регуляции тонуса церебральныхсосудов при хронической болезни почек. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. [*Lobov G.I., Sokolova I.B.* Role of NO and H2S in the Regulation of the Tone of Cerebral Vessels in Chronic Kidney Disease. Russ. J. Physiol. 106(8): 1002–1015. 2020. (In Russ)].
25. *Moroe H., Honda H.* Comparison of endothelial function in the carotid artery between 777normal and short-term hypercholesterolemic rabbits. Compar. Biochem. Physiol. C. 7 Toxicol. Pharmacol. 144(2): 197–203. 2006.

Effect of Nephrectomy on the Reactivity of Arteries from the Wistar-Kyoto Rats

V. N. Yartsev[a], *, G. T. Ivanova[a], and G. I. Lobov[a]

[a] *Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*
**e-mail: yartsevv@infran.ru*

The effect of nephrectomy on the Wistar-Kyoto rat superior mesenteric artery (SMA) and internal carotid artery (ICA) segments constriction and dilatation ability was studied under isometric conditions using myograph. 5/6 nephrectomy (5/6 Nx) in the rats 3 months old was used as a model of the chronic kidney disease. Dilatation of the phenylephrine-precontracted segments was induced by acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (SNP) in the absence and presence of potassium channels blockers (tetraethylammonium, glibenclamide) or methylene blue, a guanylyl-cyclase inhibitor. The phenylephrine-induced contraction was increased in the SMA but not in the ICA from 5/6 Nx rats. This reaction was not changed by the blockers and by inhibitor. The ACh-evoked reaction often had two phases. ACh-evoked dilatation phase of the reaction of the both arteries from 5/6 Nx rats have shown no difference from control (C) and was diminished by tetraethylammonium (in C and 5/6 Nx rats) and by methylene blue (in

C rats). In 5/6 Nx rats, ACh-evoked constriction phase of the reaction in the absence of the blockers and inhibitor was significantly larger compared to C rats only in SMA, but in the absence of tetraethylammonium, it was significantly larger in both arteries. Glibenclamide diminished ACh-induced constriction of SMA from 5/6 Nx rats, while methylene blue diminished this constriction of ICA from control rats only. We conclude that the chronic kidney disease may increase endothelium dependent and independent vasoconstriction and may change signal pathways of this constriction, which may differ in the arteries of different types.

Keywords: superior mesenteric artery, internal carotid artery, Wistar-Kyoto, nephrectomy, phenylephrine, acetylcholine

ЦИТИРОВАТЬ:

Ярцев В.Н., Иванова Г.Т., Лобов Г.И.Влияние нефрэктомии на реактивность артерий крыс линии Wistar-Kyoto. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1553–1563.
DOI: 10.31857/S0869813920120092

TO CITE THIS ARTICLE:

Yartsev V.N., Ivanova G.T., Lobov G.I. Effect of Nephrectomy on the Reactivity of Arteries from the Wistar-Kyoto Rats. Russian Journal of Physiology. 106(12): 1553–1563.
DOI: 10.31857/S0869813920120092

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1564–1570

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ РОЛИПРАМА НА ОСМОРЕГУЛИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ПОЧЕК У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВАЗОПРЕССИНА В КРОВИ

© 2020 г. П. Д. Правикова[1, *], Т. С. Курляндчик[2], Л. Н. Иванова[1, 2]

[1]*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

[2]*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

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

Поступила в редакцию 14.08.2020 г.
После доработки 28.09.2020 г.
Принята к публикации 04.10.2020 г.

Исследовано влияние селективного ингибитора фосфодиэстеразы 4 (ФДЭ-4) ролипрама, устраняющего деградацию цАМФ, на осморегулирующую функцию почек у крыс линий WAG и Brattleboro с различным уровнем вазопрессина в крови. У крыс WAG с высоким уровнем вазопрессина в крови при введении ролипрама наблюдалось значительное ускорение диуреза, обусловленное увеличением экскреции натрия, а также снижением реабсорбции осмотически свободной воды. Функциональные параметры сопровождались нарастанием гистохимически выявляемых гликозаминогликанов, определяющих проницаемость интерстициального матрикса гормон-чувствительной зоны почечной медуллы. В то же время для вазопрессин-дефицитных крыс линии Brattleboro со сниженной активностью аденилатциклазной системы в почке введение ролипрама сопровождалось развитием антидиуретической реакции без существенных изменений как параметров натрийуретической функции, так и состояния интерстициального матрикса почки. Результаты исследования свидетельствуют о значительном влиянии ролипрама, устраняющего деградацию цАМФ путем блокады ФДЭ-4, на осморегулирующую функцию почек, изменение параметров которой определяется, главным образом, уровнем вазопрессина и интеграцией эффектов, опосредованных рецепторами вазопрессина V_2- и V_{1a}-типа.

Ключевые слова: вазопрессин, ролипрам, натрийуретическая функция, аденилатциклазная система, гиалуронан

DOI: 10.31857/S0869813920120079

В системе регуляции водно-электролитного баланса у млекопитающих главная роль принадлежит почке, способной в широких пределах изменять реабсорбцию воды и натрия при отклонениях объема или осмоляльности внеклеточной жидкости. Ведущую роль в регуляции осмотического гомеостаза у млекопитающих играет нейрогипофизарный гормон вазопрессин, реализующий свой антидиуретический эффект как путем влияния на трансэпителиальный транспорт воды и ионов натрия в собирательных трубках почки [1, 2], так и путем контроля проницаемости интерстициального матрикса, основным компонентом которого является кислый гликозаминогликан гиалуронан, разделяющий элементы противоточного механизма почечной медуллы [3]. Вазопрессин способен оказывать стимулирующий или ингибирующий эффект на транспорт воды и натрия в эпителии почечных канальцев в

зависимости от вовлечения рецепторов V_2- или V_{1a}-типа, обладающих различной аффинностью [4]. V_2-рецепторы базолатеральной мембраны, активируя аденилатциклазную систему, являются триггером гидроосмотического эффекта вазопрессина, в то время как функциональная роль V_{1a}-рецепторов апикальной мембраны – торможение транспорта натрия [4, 5]. Ключевой посредник эффекта вазопрессина – цАМФ, концентрация которого определяется соотношением активности аденилатциклазы и специфических фосфодиэстераз (ФДЭ-4, 7, 8), деградирующих цАМФ [6]. Несмотря на то, что в последние годы достигнут существенный прогресс в понимании молекулярных механизмов действия вазопрессина в эпителии почечных канальцев, выявление новых звеньев в регуляции транспорта воды и ионов остается одной из наиболее интенсивно развиваемых проблем физиологии почек. Цель настоящей работы – исследование морфофункциональных особенностей почек крыс линий WAG и Brattleboro с различным уровнем эндогенного вазопрессина в крови в условиях устранения дергадации цАМФ путем введения ролипрама, селективного ингибитора ФДЭ-4 [7].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использованы крысы из центра коллективного пользования 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 половозрелых крысах инбредной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) с высоким уровнем вазопрессина в крови и гомозиготных крысах линии Brattleboro, лишенных гормона вследствие мутации гена вазопрессина [8]. Исследование выполнено в соответствии с международными рекомендациями по работе с экспериментальными животными [9]. Крысы в возрасте 60-ти дней и массой 150–200 г были разделены на 4 экспериментальные группы (по 9 особей в каждой): контрольные крысы WAG и Brattleboro, которым внутрибрюшинно вводился физиологический раствор в объеме 0.1 мл/100 г массы тела и экспериментальные особи линий WAG и Brattleboro с внутрибрюшинным введением ингибитора ФДЭ-4 ролипрама (Sigma, США) в дозе 0.4 мг/100 г массы тела дважды с интервалом 120 мин между иъекциями [10]. Ролипрам предварительно растворяли в капле 96%-ного этанола, а затем разводили в физиологическом расворе. С учетом действия препарата [11, 12], через 30 мин после второй инъекции животных помещали в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно выделяющейся мочи в течение 90 мин. По окончании эксперимента животных, предварительно анестезированных тиопенталом натрия (10 мг/100 г массы тела), декапитировали и забирали пробы крови, а также образцы почечной ткани. Осмоляльность мочи и плазмы крови определяли криоскопическим методом (миллиосмометр ОСКР-1М КИВИ, Россия). Концентрацию креатинина в моче и сыворотке крови определяли методом Яффе на спектрофотометре (BioPhotometr plus, “Eppendorf”, Германия, 490 нм). Содержание катионов натрия в пробах мочи и плазмы крови измеряли методом пламенной фотометрии (Flame photometer 410 Sherwood, Великобритания). По стандартным формулам рассчитывали клиренс осмотически активных веществ ($C_{осм}$), максимальную реабсорбцию осмотически свободной воды ($T^{C}_{H_2O}$), экскрецию натрия (E_{Na}) и экскретируемую фракцию натрия (FE_{Na}). Подготовку почечной ткани для гистохимического анализа (окрашивание альциановым синим на уровне средней трети сосочка почки) проводили по стандартному протоколу [13]. Гистологические препараты изучали с использованием светового микроскопа Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия).

Таблица 1. Влияние ингибитора ФДЭ-4 ролипрама на гидруретическую функцию крыс линий WAG и Brattleboro
Table 1. Effect of rolipram treatment on the hydrouretic function in WAG and Brattleboro rats

Показатель Parameter	Экспериментальные группы Groups			
	WAG		Brattleboro	
	контроль control	ролипрам rolipram	контроль control	ролипрам rolipram
Диурез (V), мкл/мин Diuresis (V), μl/min	1.35 ± 0.18	3.2 ± 0.16***	23.50 ± 2.80***	17.0 ± 2.10#
Реабсорбция осмотически свободной воды ($T^{C}_{H_2O}$), мкл/мин Solute-free water reabsorption ($T^{C}_{H_2O}$), μl/min	10.68 ± 0.83	7.5 ± 0.49*	–11.49 ± 2.61***	–6.78 ± 2.00

Все значения представлены как среднее ± ошибка среднего. Различия достоверны при * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой крыс линии WAG; # $p < 0.05$ – сравнение с контрольной группой линии Brattleboro.
All values are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ compared to WAG control; # $p < 0.05$ compared to Brattleboro control.

Проверку значимости фактора генотипа и действия препарата ролипрама выполняли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе Statistica 8.0. Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего (M ± SEM). Достоверность межлинейных различий оценивали с помощью апостериорного критерия Дункана (posthoc Duncan's test) для множественных сравнений. Для парного сравнения средних внутри линий применялся критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гидруретическая функция у контрольных крыс линий WAG и крыс Brattleboro, содержавшихся на стандартном водно-пищевом рационе, существенно различалась (табл. 1). У крыс WAG зарегистрирована низкая скорость мочеотделения и положительные значения показателей реабсорбции осмотически свободной воды, отражающие высокий уровень эндогенного вазопрессина. В то же время крысы линии Brattleboro, лишенные эндогенного вазопрессина, характеризовались высокой скоростью диуреза и отрицательными показателями реабсорбции воды.

Параметры натрийуретической функции у крыс двух линий также достоверно отличались (табл. 2). У вазопрессин-дефицитных крыс линии Brattleboro были выявлены более высокие показатели осмотического очищения, скорости экскреции и экскретируемой фракции натрия по сравнению с крысами линии WAG. Введение ролипрама, устраняющего деградацию цАМФ путем блокады ФДЭ-4, индуцировало принципиально различные реакции почек у крыс WAG и Brattleboro. У крыс WAG наблюдались значительные изменения натрийуретической функции: увеличение показателя осмотического очищения и скорости экскреции натрия в результате резкого нарастания экскретируемой фракции катиона (табл. 2). Торможение реабсорбции натрия у крыс WAG, по-видимому, привело к уменьшению внутрипочечного концентрационного градиента, что явилось причиной снижения реабсорбции осмотически свободной воды (табл. 1). У вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro в базальных условиях все показатели натрийуретической функции были достоверно выше, чем у крыс WAG, но изменения экскретируемой фракции

Таблица 2. Влияние ингибитора ФДЭ-4 ролипрама на натрийуретическую функцию крыс линий WAG и Brattleboro
Table 2. Effect of rolipram treatment on the natriuretic function in WAG and Brattleboro rats

Показатель Parameter	Экспериментальные группы Groups			
	WAG		Brattleboro	
	контроль control	ролипрам rolipram	контроль control	ролипрам rolipram
Клиренс осмотически активных веществ ($C_{осм}$), мкл/мин Clearance of osmotic active compounds (C_{osm}), μl/min	7.59 ± 0.94	11.78 ± 1.03**	12.68 ± 0.34**	10.97 ± 0.66
Скорость экскреции натрия (E_{Na}), мкмоль/мин Sodiumexcretion (E_{Na}), μmol/min	0.03 ± 0.005	0.30 ± 0.04***	0.18 ± 0.04*	0.23 ± 0.03
Экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}), % Fractional excretion of sodium (FE_{Na}), %	0.10 ± 0.002	1.28 ± 0.16***	0.26 ± 0.01*	0.35 ± 0.01

Все значения представлены как среднее ± ошибка среднего. Различия достоверны при *$p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой WAG.
All values are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – compared to WAG control.

натрия и скорости его экскреции при введении ролипрама оказались несущественными (табл. 2). Снижение диуреза при введении ролипрама у крыс Brattleboro было связано с нарастанием реабсорбции воды (табл. 1).

Как известно, вазопрессин, помимо регуляции факультативной реабсорбции воды, оказывает существенное влияние на транспорт натрия в эпителии почечных канальцев [14, 15], направленность которого зависит от аффинности различного типа рецепторов вазопрессина и определяется его концентрацией в крови [5, 15]. При нормальном физиологическом уровне секреции вазопрессина проявляется антинатрийуретическая реакция, обусловленная активацией V_2-рецепторов. В то же время при увеличении секреции вазопрессина в условиях дегидратации активируются V_{1a}-рецепторы апикальной мембраны, трансдукция сигналов которых приводит к усилению скорости выведения натрия [4]. Исходя из этого, обнаруженные особенности реакции на ролипрам у крыс WAG, очевидно, были обусловлены интеграцией эффектов активации V_2- и V_{1a}-типа рецепторов вазопрессина, обладающих различной аффинностью к гормону [4, 15]. У крыс линии WAG ролипрам повышал содержание трансмиттера гормона (цАМФ) до характерных высокому уровню вазопрессина в крови значений, что способствовало активации V_{1a}-рецепторов, трансдукция сигнала которых по фосфолипазному сигнальному пути в условиях повышения внутриклеточного содержания Ca^{2+} [16, 17] приводила к подавлению реабсорбции натрия и проявлению значительного натрийуреза [4]. Выявленное снижение концентрирующей функции у крыс WAG в условиях введения ролипрама является следствием негативной модуляции антидиуретического эффекта вазопрессина, обусловленное, по всей видимости, снижением проницаемости канальцев почки для солей и воды, стимулированной V_2-рецепторами вазопрессина [18]. У крыс линии Brattleboro со сниженной активностью всех изоформ аденилатциклазы [19] ролипрам повышал уровень цАМФ до значений, характерных для активации V_2-рецепторов, соответственно вызывая нарастание реабсорбции воды и падение диуреза без значительных изменений экскреции натрия (табл. 1, 2).

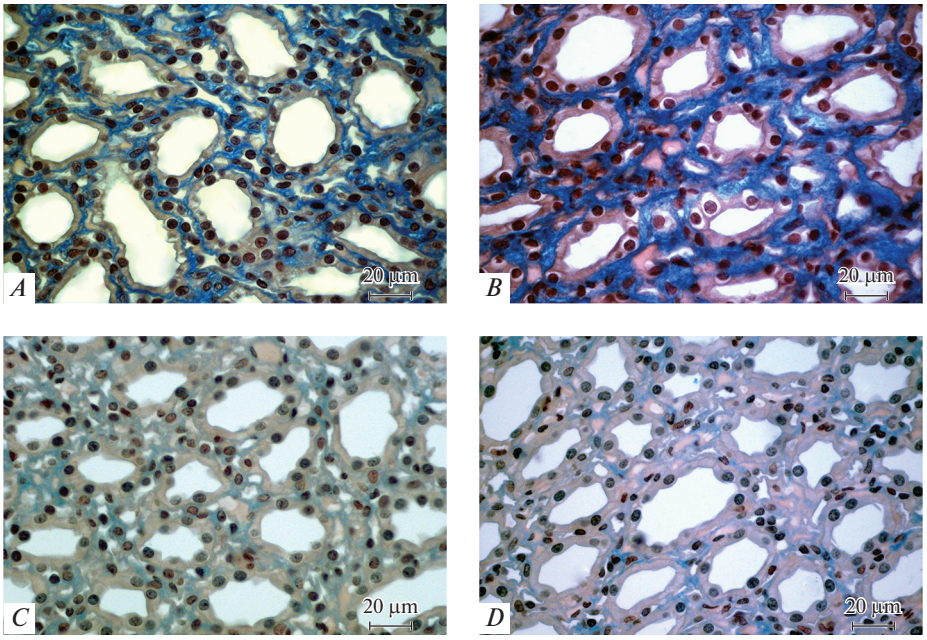


Рис. 1. Влияние ФДЭ-4 ингибитора ролипрама на локализацию гиалуронана средней трети сосочка у крыс WAG и крыс Brattleboro.
A – WAG контроль (1819 мОсм/кг H_2O); *B* – WAG, введение ролипрама (891 мОсм/кг H_2O); *C* – Brattleboro контроль (123 мОсм/кг H_2O); *D* – Brattleboro, введение ролипрама (310 мОсм/кг H_2O). В скобках дано значение осмоляльности мочи. Окрашивание алциановым синим, объектив ×63. Снимки выполнены с помощью цифровой фотонасадки AxioCam.

Fig. 1. Effect of selective PDE-4 inhibitor (rolipram) on localization of hyaluronan in the middle third of the renal papilla in WAG and Brattleboro rats.
A – WAG control (1819 mOsm/kg H_2O); *B* – WAG, injection of rolipram (891 mOsm/kg H_2O); *C* – Brattleboro control (123 mOsm/kg H_2O); *D* – Brattleboro, injection of rolipram (310 mOsm/kg H_2O). Remarks: values of urine osmolality are given in brackets. Alcian blue staining, lens x63. The photos were taken with the AxioCam digital camera attachment.

Барьер на пути движения воды и солей из канальцев в кровоток, как известно, представлен не только эпителием, но также внеклеточным матриксом, основным компонентом которого является гликозаминогликан гиалуронан, разделяющий элементы концентрирующей противоточной системы и, в зависимости от полимерности его молекул, определяющий скорость диффузии воды и солей в интерстиции почечной медуллы по осмотическому градиенту [20]. Как известно, продуцентом гиалуронана в медуллярной зоне почки являются интерстициальные клетки, секреторная активность которых зависит от осмоляльности интерстициальной жидкости и регулируется как системными гормонами (вазопрессином, ангиотензином и др.), так и локальными почечными факторами (ПГЕ2, NO и др.), рецепторы которых экспрессируются на клеточной мембране интерстициальных клеток [21, 22]. При гистохимическом исследовании срезов почечной ткани контрольных крыс WAG, экскретирующих мочу с осмоляльностью выше 1800 мОсм/кг H_2O выявлена типичная для действия вазопрессина структура медуллярной зоны: уплощенный эпителий собирательных трубок, открытая дренажная сеть множества капилляров и слабое окрашивание кислых гликозаминогликанов интерстиция (рис. 1*A*). При

введении ролипрама у крыс WAG развитие диуреза и снижение осмоляльности мочи, обусловленное торможением реабсорбции воды, сопровождалось повышением высоты клеток эпителия собирательных трубок и увеличением интенсивности окрашивания гиалуронана интерстициального матрикса по сравнению с контролем (рис. 1*B*). Для интактных гомозиготных вазопрессин-дефицитных крыс линии Brattleboro характерно практически полное отсутствие гистохимически выявляемых гликозаминогликанов интерстициального матрикса почечной медуллы (рис. 1*C*) [3], структура которого при введении ролипрама на фоне отсутствия изменений параметров осморегулирующей функции не претерпевает значимых изменений (рис. 1*D*).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о значительном эффекте ролипрама, оказывающего влияние на аденилатциклазную систему путем устранения деградации цАМФ, на осморегулирующую функцию почек, изменение параметров которой определяется уровнем вазопрессина в крови и интеграцией эффектов его рецепторов V_{1a}- и V_2-типа.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-04-00298 А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Agre P., King L.S., Yasui M., Guggino Wm.B., Ottersen O.P., Fujiyoshi Y., Engel A., Nielsen S.* Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. J. Physiol. 542: 3–16. 2002.
2. *Pearce D., Soundararajan R., Trimpert C., Kashlan O.B., Deen P.M.T., Kohan D. E.* Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 10: 135–146. 2015.
3. *Ivanova L.N., Babina A.V., Baturina G.S., Katkova L.E.* Effect of vasopressin on the expression of genes for the key enzymes of hyaluronan turmover in WAG and Brattleboro rat kidney. Exp Physiol. 98(11): 1608–1619. 2013.
4. *Perucca J., Bichet D.G., Bardoux P., Bouby N., Bankir L.* Sodium excretion in response to vasopressin and selective vasopressin receptor antagonists. J. Am. Soc. Nephrol. 19: 1721–1731. 2008.
5. *Golosova D.V., Karavashkina T.A., Kutina A.V., Marina A.S., Natochin Y.V.* Effects of Selective Agonists of V1a, V2, and V1b Receptors on Sodium Transport in Rat Kidney. Bull. Exp. Biol. Med. 160(6): 751–754. 2016.
6. *Francis S.H., Blount M.A., Corbin J.D.* Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. Physiol. Rev. 91: 651–690. 2011.
7. *Coffey A.K., O'Sullivan D.J., Homma S., Dousa T.P., Valtin H.* Induction of intramembranous particle clusters in mice with nephrogenic diabetes insipidus. Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol. 261: F640–F646. 1991.
8. *Valtin H., Schroeder H.A.* Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro rata).1964 [classical article]. J. Am. Soc. Nephrol. 8: 1333–1341. 1997.
9. *Hubrecht R., Kirkwood J. Hertfordshire S.T.* (Eds). The UFAW Handbook on the Care and Managementof Laboratory Animals. 2010.
10. *Ding H., Bai F., Cao H., Xu J., Fang L., Wu J., Yuan Q., Zhou Y., Sun Q., He W., Dai C., Zen K., Jiang L., Yang J.* PDE/cAMP/Epac/C/EBP-beta signaling cascade regulates mitochondria biogenesis of tubular epithelial cells in renal fibrosis. Antioxid. Redox Signal. 29: 637–652. 2018.
11. *Tanahashi M., Hara S., Yoshida M., Suzuki-Kusaba M., Hisa H., Satoh S.* Effects of rolipram and cilostamide on renal functions and cyclic AMP release in anesthetized dogs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 289: 1533–1538. 1999.
12. *Ahloulay M., Bankir L., Lugnier C., Le Bec A., Poirel O.* Cyclic AMP-phosphodiesterases inhibitor improves sodium excretion in rats with cirrhosis and ascites. Liver Int. 25: 403–409. 2005.
13. *Bancroft J., Gamblee M.* Theory and practice of histological techniques. London. 2002.
14. *Cheng C.Y., Chu J.Y., Chow B.K.* Vasopressin-independent mechanisms in controlling water homeostasis. J. Mol. Endocrinol. 43: 81–92. 2009.
15. *Bankir L., Bichet D.G., Bouby N.* Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? Am. J. Physio. Renal Physiol. 299: F917– F928. 2010.
16. *Thibonnier M., Coles P., Thibonnier A., Shoham M.* Molecular pharmacology and modeling of vasopressin receptors. Prog. Brain Res. 139: 179 –196. 2002.

17. *Koshimizu T., Nakamura K., Egashira N., Hiroyama M., Nonoguchi H., Tanoue A.,* Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. Physiol. Rev. 92. 1813–1864. 2012.
18. *Ledderhos C., Matsin D.L., Skelton M.M., Cowley A.W.* In vivo diuretic actions of renal vasopressin V1 receptor stimulation in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol. 268: 796–807. 1995.
19. *Schen T., Suzuki Y., Poyard M., Miyamoto N., Defer N., Hanoune J.* Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the adult, in developing, and in the Brattleboro rat kidney. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 273: 323–330. 1997.
20. *Stridh S., Palm F., Hansell P.* Renal interstitial hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol. 302(11): R1235–R1249. 2012.
21. *Göransson V., Johnsson C., Nylander O., Hansell P.* Renomedullary and intestinal hyaluronan content during body water excess. A comparative study in rats and gerbils. J. Physiol. 542(1): 315–322. 2002.
22. *Rügheimer L., Johnsson C., Maric C., Hansell P.* Hormonal regulation of renomedullary hyaluronan. Acta Physiol. (Oxford) 193: 191–198. 2008.

Effect of Rolipram Treatment on the Osmoregulatory Renal Function in Rats with Different Blood Vasopressin Level

P. D. Pravikova[a, *], T. S. Kurlandchik[b], and L. N. Ivanova[a, b]

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

[b] *Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia*

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

The effect of the selective PDE-4 inhibitor rolipram, which eliminates cAMP degradation, on osmoregulatory function in WAG and Brattleboro rats with different blood vasopressin (AVP) level was studied. It was found that in WAG rats with high endogenous AVP level treatment of rilipram induced the significant acceleration of the urine flow rate as a result of the increase in sodium excretion and also the decrease in solute-free water reabsorption. The changes in the functional parameters were followed by an increase in the content of glycosaminoglycans, which determine the permeability of the interstitial matrix in the AVP-sensitive renal medulla. At the same time in AVP-deficient Brattleboro rats with low adenylate cyclase system activity in the kidney rolipram treatment induced the development of the antidiuretic response whithout changes in the parameters of natriuretic function and the state of the interstitial renal matrix. These results showed a significant influence of rolipram, which eliminates the degradation of cAMP by the inhibition of PDE4, on the osmoregulatory renal function, changes parameters of which are mainly determined by the AVP level and the integration of effects mediated by V_2- and V_{1a}-like vasopressin receptors.

Keywords: vasopressin, rolipram WAG and Brattleboro rats, natriuretic functions, adenylate cyclase system, hyaluronan

ЦИТИРОВАТЬ:

Правикова П.Д., Курляндчик Т.С., Иванова Л.Н. Влияние ролипрама на осморегулирующую функцию почек у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1564–1570.

DOI: 10.31857/S0869813920120079

TO CITE THIS ARTICLE:

Pravikova P.D., Kurlandchik T.S., Ivanova L.N. Effect of Rolipram Treatment on the Osmoregulatory Renal Function in Rats with Different Blood Vasopressin Level. Russian Journal of Physiology. 106(12): 1564–1570.

DOI: 10.31857/S0869813920120079

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 12, с. 1571–1584

МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОСТАВКИ ГЕНОВ В КЛЕТКИ МОЗГА РЫБ ПРИ ПОМОЩИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ ГИППОКАМПА МЫШИ

© 2020 г.
Е. В. Пущина[1, 2, *], Я. Н. Александрова[1], А. А. Вараксин[1], Д. К. Обухов[3]

[1]*Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия*

[2]*Институт физиологии им. Богомольца Национальной академии наук Украины, Киев, Украина*

[3]*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

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

Поступила в редакцию 11.04.2020 г.
После доработки 04.06.2020 г.
Принята к публикации 26.08.2020 г.

Вирусные векторы представляют собой гибкую систему, которая может эффективно доставлять экзогенный генетический материал в различные клетки-мишени и, таким образом, является потенциально мощным инструментом для генетических манипуляций. Для доставки вирусных генов проводилась инъекция рекомбинантных аденоассоциированных векторов по методу Wallace [1]. Использование рекомбинантных аденоассоциированных векторов позволяет вирусным частицам сравнительно легко диффундировать из области инъекции и достаточно быстро воспроизводиться в клетках мозга. Целью работы было исследование эффективности инфекции аденоассоциированных вирусных векторов млекопитающих в различных областях мозга кеты *Oncorhynchus keta* в возрасте 2 лет при краткосрочных (4 и 8 дней) и долговременном (10 недель) интервалах с последующей ультраструктурной диагностикой нервной ткани в области инъекции. Было установлено, что аденоассоциированный вектор гиппокампа мыши AAV-1 эффективно инфицировал клетки мозга кеты. Инъекция AAV в различные области мозга: конечный мозг, мозжечок, мезэнцефалический тектум и тегментум кеты индуцировала экспрессию репортерных генов в паллиальных (Dd и Dm) областях конечного мозга, крыше и покрышке среднего мозга, в дорсальной части ствола мозга, а также в мозжечке (*valvula* и *corpus cerebellum*). Методами флуоресцентной микроскопии показано, что наличие зеленой флуоресценции связано с экспрессией зеленого флуоресцентного протеина (GFP) в клетках мозга кеты. Данные ультраструктурного анализа подтвердили наличие субклеточных вирусных частиц в клетках мозга и межклеточном пространстве, что свидетельствует о способности к диффузному распространению аденоассоциированного вектора в нервной ткани мозга кеты.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирусный вектор, аденовирусный вектор высокой емкости, *Oncorhynchus keta*, тектум, тегментум, мозжечок, продолговатый мозг

DOI: 10.31857/S0869813920110096

В настоящее время аденовирусные векторы все чаще используются для доставки генетического материала в различные клетки организма. Однако согласно данным

[2], аденоассоциированные векторы в ряде случаев обладают токсическим действием на организм млекопитающих, что снижает эффективность их использования. Известно, что аденовирусы способны заражать все классы позвоночных животных, однако менее патогенны для низших позвоночных, в частности, рыб. Для нейрогенетических исследований рыбы все чаще используются в качестве модельных животных, что связано с относительной простотой их содержания по сравнению с дорогостоящими млекопитающими (особенно приматами), а также с упрощенными биоэтическими нормами при работе с водными позвоночными. Таким образом, аденовирусные системы являются перспективными для генной трансдукции в клетки рыб с целью вакцинации или других экспериментальных исследований, связанных с экспрессией специфических генов. Исследования на медаке и данио показали, что трансдукция AAV в культивируемые соматические клетки Сертоли приводит к эффективной экспрессии трансгенов, это позволяет использовать аденовирусы в качестве хромосомно-неинтегрирующей векторной системы [3]. В исследованиях на белом осетре *Acipenser transmontanus* был выделен отдельный высокоспецифичный штамм аденовируса с уникальной последовательностью, позволяющей его рассматривать в качестве нового таксономически независимого класса аденовирусов [4, 5].

В исследованиях, проведенных в Национальном институте генетики (Япония), было установлено, что аденовирус (Ad) эффективно вводит двухцепочечную ДНК в клетки, экспрессирующие аденовирусный рецептор Коксаки, но не интегрируется в геном хозяина [6]. Результаты разработок отдела геномной терапии Сайтамского медицинского университета показали, что хелпер-зависимый вектор (с удаленным вирусным геномом) является менее цитотоксичным, чем E1-делеционный вектор, и поэтому может использоваться для достижения множественного инфицирования [7]. Тем не менее, в Университете Осака было разработано более масштабное клонирования хелпер-зависимых векторов, облегчающих репарацию генов посредством гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши и приматов [8]. Исследования, проводимые на кафедре радиационной генетики университета Киото, показали, что адено-ассоциированный вирус (AAV) является перспективным вектором для генного таргетинга и относится к другому, отличному от Ad типу вируса, который с низкой частотой вводит одноцепочечную ДНК в клетки генома хозяина [9]. Аденоассоциированные вирусы с успехом были использованы для коррекции доминантной мутации в мезенхимальных стволовых клетках у пациентов с несовершенным остеогенезом [10]. Таким образом, оба типа вирусов являются достаточно эффективными для быстрой доставки генетического материала и могут быть использованы для генной терапии.

Ранее в исследованиях на радужной форели было показано, что аденовирусные векторы человека 5-го типа могут эффективно доставлять трансгены в культивируемые клетки мышц [11]. В других работах была установлена эффективная экспрессия репортерных генов в клетках эмбриональной линии (CHSE-214) китайского лосося, папулезной эпителиомы карпа, лейкоцитах американского угря (PBLE), гонад (RTG-2), жабер (RT-GillW1) и селезенки (RTS-34) радужной форели [12]. Исследования на нервной системе рыб в настоящее время ограничиваются данными на эмбрионах данио [13] и медаке *Oryzias latipes* [14]. Целью настоящей работы было исследование эффективности инфекции *in vivo* аденоассоциированных вирусных векторов AAV-1 в различных областях мозга кеты *Oncorhynchus keta* при кратковременных (4 и 8 дней) и долговременной (10 недель) инкубации с последующей ультраструктурной диагностикой нервной ткани в области инъекции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе было использовано 24 особи тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta* в возрасте 23–24 мес., с длиной тела 30–35 см и массой 285–330 г. Рыбы были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2017 г. Молодь кеты содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением в течение суток. Соотношение освещенного и темнового периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде составляло 7–10 мг/дм^3, что соответствует нормальному насыщению. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемыми уставом ННЦБМ и Этической комиссией, регламентирующей гуманное обращение с экспериментальными животными.

Введение аденоассоциированного вирусного вектора. В работе использовали готовые рекомбинантные аденоассоциированные вирусы гиппокампа мыши AAV-1. Camc2a.GCaMP6f.WPRE.bGHpA (Inscopix, США). Упаковка, очистка, и определение векторных титров были выполнены в Стэндфордском университете (Inscopix, США). Рекомбинантные векторы очищали с использованием метода осаждения CsCl, и титры геномной копии были определены, как описано ранее [15]. Титры инъекций были оптимизированы по концентрации и составляли 1.68E (13 мкг/мл), что функционально подтверждено для кальциевой визуализации пирамидных нейронов в дорсальном CA1 гиппокампе мыши.

Рыбы были анестезированы в 0.1%-ном растворе трикаин-метансульфоната MS222 (Sigma, США) в течение 5–10 мин. После анестезии первой группе животных в область правого полушария теленцефалона с помощью шприца Гамильтона вводили 0.2 мкл раствора рекомбинантного AAV на 0.1 М фосфатном буфере ($n = 4$ для каждой группы). Контрольные животные получали 0.2 мкл 0.1 М фосфатного буфера ($n = 4$). Через 4 дня после инъекции животные выводились из эксперимента и подвергались эвтаназии методом быстрой декапитации. Второй группе животных в область мозжечка, правого полушария тектума и тегментума вводили аналогичный объем раствора рекомбинантного AAV ($n = 4$ для каждой группы), а контрольные животные получали соответствующее количество 0.1 М фосфатного буфера ($n = 4$). Через 8 дней после инъекции животные выводились из эксперимента. Третьей группе животных в область мозжечка вводили раствор AAV ($n = 4$ для каждой группы), группа контрольных животных ($n = 4$) получала 0.1 М фосфатный буфер. Через 10 недель после инъекции животные третьей группы выводились из эксперимента аналогичным способом.

Головной мозг инъецированных рыб префиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в том же растворе в течение 2 ч при температуре 4°C. Затем в течение двух суток промывали в 30%-ном растворе сахарозы при 4°C, с пятикратной сменой раствора. Серийные фронтальные срезы мозга кеты толщиной 50 мкм изготавливали с помощью замораживающего микротома (Cryo-star HM 560 MV, Thermo Scientific, США).

Микроскопия. В работе для визуализации и проведения морфологического анализа был использован моторизированный инвертированный микроскоп исследовательского класса с флуоресцентным модулем и приставкой улучшенного контрастирования при работе с люминесценцией Axiovert 200 M с модулем ApoTome (Carl Zeiss, Германия). Для исследования микрофотографии препаратов и анализ материала осуществляли с помощью программы Axio Vision (Carl Zeiss, Германия). Измерения проводили при использовании объективов с увеличением 10×, 20× и 40× в 10 случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования.

Подсчет количества GFP-экспрессирующих клеток в поле зрения осуществляли при увеличении 200×. Морфометрический анализ параметров клеточных тел (измерение большого и малого диаметров сомы нейронов) проводили с помощью программного обеспечения микроскопа Axio Vision.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Различные отделы мозга кеты в соответствии со схемой введения AVV (4 дня, 8 дней и 10 недель соответственно) были зафиксированы в 2.5%-ном глютаральдегиде на 0.1 М какодилатном буфере и постфиксировали в 2%-ном растворе осмия на 0.1 М какодилатном буфере. Материал заливали в смолу LR White. Ультратонкие срезы толщиной 60 нм были получены на ультрамикротоме Ultracut Leica UC6 (Leica Microsystems, Германия). Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа SIGMA 300 VP (Zeiss AG, Карл Цейсс, Германия).

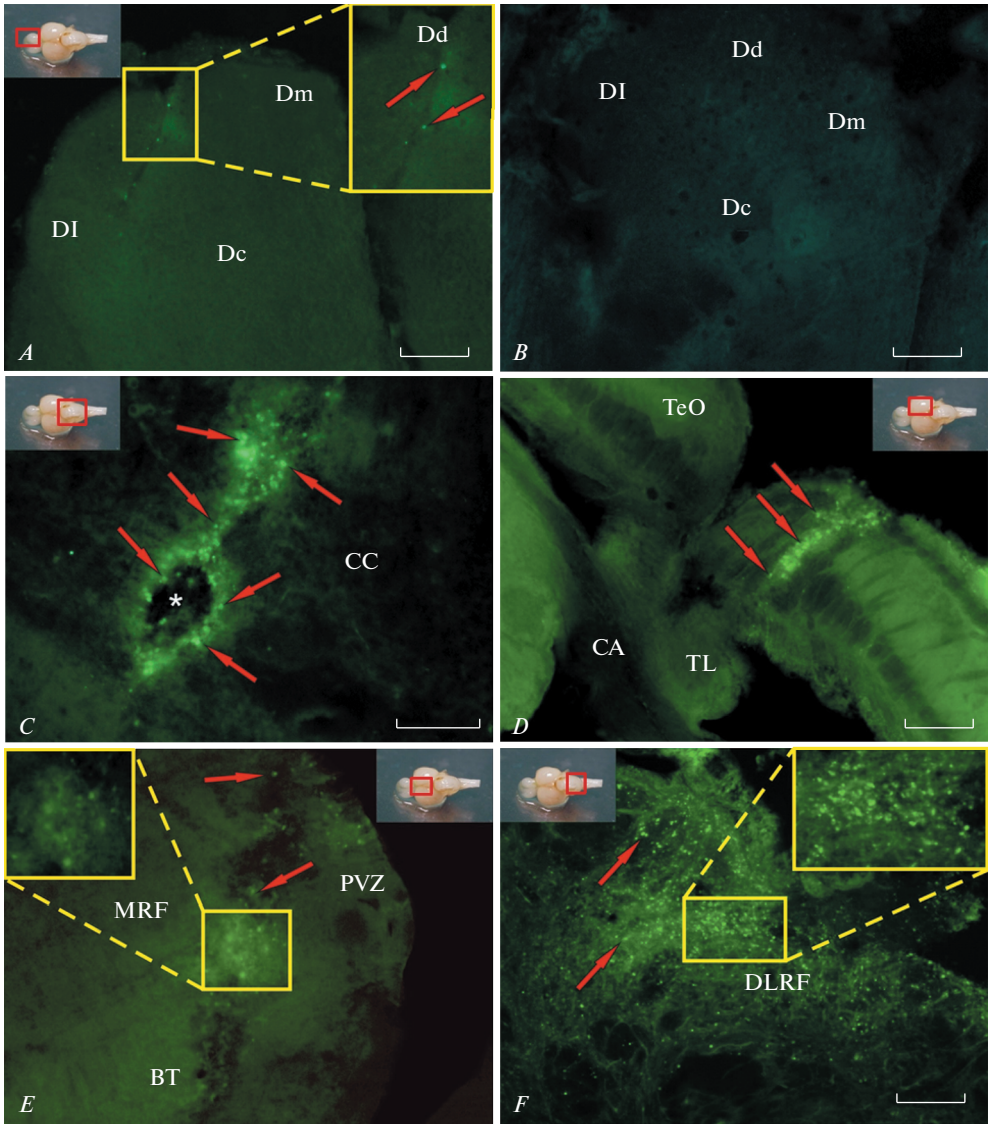
Статистическая обработка данных. Количественная обработка результатов была выполнена с помощью программ Описательная статистика Microsoft Excel 2010 и Statistica 12. Плотность распределения и размерные характеристики клеток оценивались с помощью методов вариационной статистики. Для количественной оценки результатов находились средние значения и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Измерения в группах сравнивались с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA). Значения при $p \leq 0.05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате однократного введения AVV в различные отделы головного мозга кеты были выявлены GFP-экспрессирующие клетки в областях инъекции и в отдельных случаях в прилежащих проекционных областях мозга (рис. 1*A*–*F*).

Рис. 1. Экспрессия GFP в различных областях мозга кеты *Oncorhynchus keta* после инъекции аденоассоциированного вектора гиппокампа мыши (AAV). *A* – зеленый флуоресцентный протеин (GFP)-экспрессирующие клетки (красные стрелки) вокруг области инъекции в теленцефалон через 4 дня после введения AAV, на врезке – увеличенный фрагмент (в желтом прямоугольнике), красным прямоугольником в правом верхнем углу показана область инъекции; Dd – дорсальная, Dm – медиальная, Dl – латеральная, Dc – центральная зоны паллиума. *B* – срез теленцефалона контрольного животного. *C* – GFP-экспрессирующие клетки вокруг области инъекции (показана белой звездочкой) в мозжечок через 8 дней после введения AAV. *D* – вокруг области инъекции в оптический тектум (TeO), CA – передняя комиссура, TL – продольный торус. *E* – GFP-экспрессирующие клетки в тегментуме через 8 дней после введения AAV; PVZ – перивентрикулярная зона тегментума, MRF – мезенцефалическая ретикулярная формация, BT – базальный тегментум. *F* – GFP-экспрессирующие клетки в дорсо-латеральной ретикулярной формации (DLRF) через 10 недель после введения AAV в мозжечок. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм.

Fig. 1. GFP expression in various brain regions of chum salmon *Oncorhynchus keta* after AAV injection. *A* – GFP-expressing cells (red arrows) around the injection area in the telencephalon 4 days after the injection of AAV, the inset shows the enlarged fragment (in the yellow rectangle), the injection area is shown in the red rectangle in the upper right corner; Dd – dorsal, Dm – medial, Dl – lateral, Dc – central pallium zone. *B* – section of the telencephalon of the control animal. C – GFP-expressing cells around the injection area (indicated by a white star) in the cerebellum 8 days after the injection of AAV. D – around the area of injection into the tectum opticum (TeO), PC – anterior commissure, TP – torus longitudinalis. E – GFP-expressing cells in tegmentum 8 days after the injection of AAV; PVZ – periventricular zone of the tegmentum, MRF – mesencephalic reticular formation, and BT – basal tegmentum. F – GFP-expressing cells in the dorsolateral reticular formation (DLRF) 10 weeks after the injection of AAV into the cerebellum. Fluorescence microscopy. The scale bar – 200 microns.



Через 4 дня после введения AAV в правое полушарие конечного мозга вокруг области инъекции были выявлены отдельные GFP-экспрессирующие клетки (рис. 1*A*). После инъекции в дорсальную зону паллиума кеты GFP-экспрессирующие клетки были также обнаружены в дорсальном скоплении (Dd), медиальной части паллиума (Dm) и в центральной (Dc) зоне (табл. 1, рис. 2). Во всех областях паллиума, содержащих трансгенную экспрессию AAV, преобладали клетки небольших размеров за исключением центральной области, содержащей более крупные нейроны (табл. 1). Сравнительное распределение GFP-экспрессирующих клеток показано на рис. 2. В центральной области и участках, ограничивающих зону инъекции, количество клеток, экспрессирующих репортерные гены, было ниже, чем в поверхностных

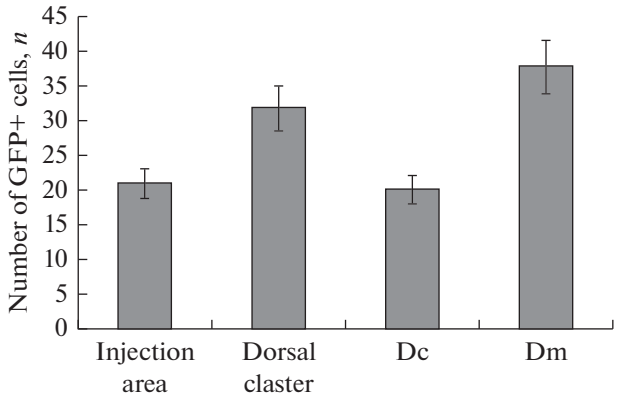


Рис. 2. Сравнительное распределение GFP-экспрессирующих клеток ($M \pm SD$) в различных областях теленцефалона кеты *Oncorhynchus keta* через 4 дня после введения AAV.

Fig. 2. Comparative distribution of GFP-expressing cells ($M \pm SD$) in various regions in the telencephalon of chum salmon *Oncorhynchus keta* 4 days after the injection of AAV.

слоях дорсальной и медиальной паллиальных зон (рис. 2). На контрольных препаратах GFP-экспрессирующие клетки выявлены не были (рис. 1*B*).

Через 8 дней после введения AAV в дорсальную часть тела мозжечка вокруг области инъекции визуализировались многочисленные GFP-экспрессирующие клетки (рис. 1*C*). Нейроны, экспрессирующие трансгены и образующие другую центрально расположенную популяцию, были обнаружены в каудальной части тела мозжечка, а также в заслонке мозжечка, дистанционно удаленной от зоны инъекции

Таблица 1. Морфометрические параметры* GFP-экспрессирующих клеток в теленцефалоне кеты *Oncorhynchus keta* через 4 дня после инъекции AAV

Table 1. Morphometric parameters* of GFP-expressing cells in the telencephalon of chum salmon *Oncorhynchus keta* 4 days after AAV injection

Типы клеток Cell types	Область инъекции Injection area	Дорсальное скопление Dorsal cluster	Медиальная зона паллиума Dm	Центральная зона паллиума Dc
Размеры клеток ($M \pm SD$), мкм Cell sizes ($M \pm SD$), μm	7.8 ± 0.6/5.8 ± 0.7 5.8 ± 0.6/4.6 ± 0.8	7.6 ± 0.4/5.6 ± 0.5 6.2 ± 0.7/5.1 ± 0.6	7.8 ± 0.6/5.8 ± 0.7 5.8 ± 0.6/4.6 ± 0.8	12.8 ± 0.6/10.4 ± 1.4 9.5 ± 0.2/7.7 ± 0.9 7.9 ± 0.6/6.0 ± 0.6

* Значения большого и малого диаметров клеточных перикарионов показаны через косую черту соответственно.

* Values of the large and small diameters of cellular pericarions are shown through a slash respectively.

Таблица 2. Морфометрические параметры GFP-экспрессирующих клеток в мозжечке кеты *Oncorhynchus keta* через 8 дней после инъекции AAV

Table 2. Morphometric parameters* of GFP-expressing cells in the cerebellum of chum salmon *Oncorhynchus keta* 8 days after AAV injection

Типы клеток Cell types	Область инъекции Injection area	Центральное скопление Central cluster	Молекулярный слой Molecular layer	Заслонка Valvulla cerebelli
Размеры клеток ($M \pm SD$), мкм Cell sizes ($M \pm SD$), μm	10.2 ± 0.2/7.3 ± 0.6 8.9 ± 0.6/7.1 ± 0.6 7.2 ± 0.6/6.1 ± 0.7	11.3 ± 0.6/10.0 ± 0.5 9.3 ± 0.4/8.3 ± 0.9	8.0 ± 0.5/5.3 ± 0.5 6.8 ± 0.3/4.9 ± 0.6 5.0 ± 0.7/3.8 ± 0.6	10.2 ± 0.4/7.1 ± 0.2 7.8 ± 0.4/5.9 ± 0.8 6.3 ± 0.7/5.4 ± 0.8

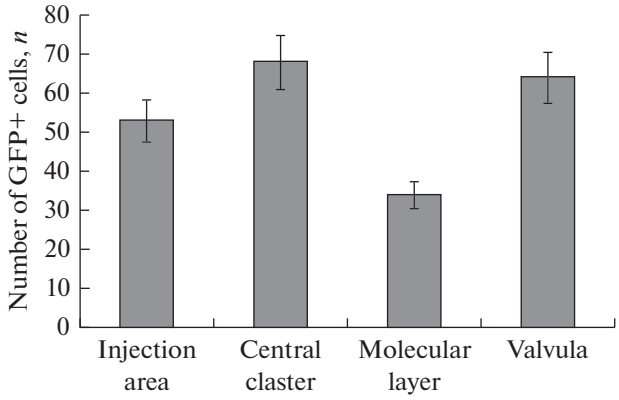


Рис. 3. Сравнительное распределение GFP-экспрессирующих клеток ($M \pm SD$) в различных областях мозжечка кеты *Oncorhynchus keta* через 8 дней после введения AAV.

Fig. 3. Comparative distribution of GFP-expressing cells ($M \pm SD$) in various regions in the cerebellum of chum salmon *Oncorhynchus keta* 8 days after the injection of AAV.

(табл. 2, рис. 3). Морфометрические параметры GFP-экспрессирующих клеток свидетельствуют о гетерогенности популяции, содержащей трансгены в указанном временном диапазоне. Большинство GFP-экспрессирующих клеток было выявлено в молекулярном слое (рис. 3). Наличие большого количества клеток, экспрессирующих трансгены в заслонке мозжечка, свидетельствует о способности AAV к антероградному транспорту в трансцеребеллярную зону (рис. 3).

Введение AAV в медиальную часть оптического тектума и более глубокие слои покрышки среднего мозга через аналогичный промежуток времени показало наличие GFP-экспрессирующих нейронов в зрительном тектуме (рис. 1*D*) и в различных регионах тегментума (рис. 1*E*, табл. 3). Морфометрический анализ различных областей мезенцефалона выявил более крупные клетки, содержащие репортерные гены, чем в конечном мозге и мозжечке (табл. 1–3). Высокая морфологическая гетерогенность позволяет выделять несколько типов GFP-экспрессирующих клеток в тектуме, перивентрикулярных и субвентрикулярных областях тегментума, мезенцефалической ретикулярной формации и базальном тегментуме (табл. 3). Анализ распределения GFP-экспрессирующих клеток показал, что в данном временном диапазоне наибольшее количество нейронов, содержащих трансгены, выявлено в оптическом тектуме и MRF (рис. 4).

Таблица 3. Морфометрические параметры GFP-экспрессирующих клеток в мезенцефалоне кеты *Oncorhynchus keta* через 8 дней после инъекции AAV

Table 3. Morphometric parameters of GFP-expressing cells in the mesencephalon of chum salmon *Oncorhynchus keta* 8 days after AAV injection

Типы клеток Cell types	Зрительный тектум Tectum opticum	Тегментум ПВЗ и СВЗ Tegmentum PVZ, SVZ	Мезенцефалическая ретикулярная формация MRF	Базальный тегментум Basal tegmentum
Размеры клеток ($M \pm SD$), мкм Cell sizes ($M \pm SD$), μm	17.0 ± 0.8/10.8 ± 2.4 14.8 ± 1.0/11.0 ± 1.9 11.2 ± 1.0/8.3 ± 1.5 8.8 ± 0.5/7.9 ± 0.3	19.8 ± 1.2/15.9 ± 0.8 11.9 ± 0.9/9.8 ± 1.8 8.9 ± 0.6/7.6 ± 0.9 7.2 ± 0.6/4.9 ± 0.8	11.0 ± 1.4/8.6 ± 2.4 8.6 ± 0.7/6.4 ± 0.7 7.0 ± 0.6/5.7 ± 0.7 5.8 ± 0.2/4.8 ± 1.4	11.3 ± 0.6/9.8 ± 0.8 8.8 ± 0.5/6.7 ± 0.7 6.9 ± 0.7/5.8 ± 1.0

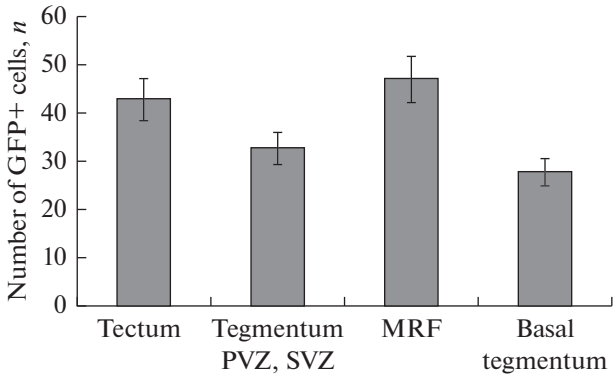


Рис. 4. Сравнительное распределение GFP-экспрессирующих клеток ($M \pm SD$) в различных областях мезенцефалона кеты *Oncorhynchus keta* через 8 дней после введения AAV.

Fig. 4. Comparative distribution of GFP-expressing cells ($M \pm SD$) in various regions in the mesencephalon of chum salmon *Oncorhynchus keta* 8 days after the injection of AAV.

Через 10 нед. после инъекции AAV в тело мозжечка популяции GFP-экспрессирующих клеток были обнаружены как в области инъекции и прилежащей центральной зоне мозжечка, так и в составе антероградных экстрацеребеллярных проекций ростральной части ствола – дорсо-латеральной ретикулярной формации (DLRF) и медиальной ретикулярной формации (MRF) (табл. 4). Большая популяция GFP-экспрессирующих нейронов была выявлена в DLRF (рис. 1*F*, рис. 5). В составе MRF были выявлены наиболее крупные нейроны, содержащие репортерные гены (табл. 4).

Долговременная 10-недельная экспозиция после инъекции AAV привела к широкому распространению клеток, экспрессирующих трансгены, и частиц субклеточного размера в области инъекции, а также в составе антероградных, ретроградных и, возможно, реципрокных проекционных областей ствола (рис. 6*A*). Исследование данных областей в режиме фазового контраста показало наличие большого числа плотных телец темного цвета в области локализациии GFP-экспрессирующих клеток (рис. 6*B*). При увеличении данных областей AAV-содержащие участки продолговатого мозга выглядели как темные оптически-плотные скопления, хорошо различимые в режиме проходящего света (рис. 6*C*). Ультраструктурное исследование данных областей показало, что скопления аденоассоциированных вирусов выглядят как темные гранулосодержащие внутри- и внеклеточные структуры, в составе которых различимы отдельные вирусные частицы (рис. 6*D*).

Таблица 4. Морфометрические параметры GFP-экспрессирующих клеток в мозжечке и ростральной части ствола мозга кеты *Oncorhynchus keta* через 10 недель после инъекции AAV

Table 4. Morphometric parameters of GFP-expressing cells in the cerebellum and rostral part of brainstem of chum salmon *Oncorhynchus keta* 10 weeks after AAV injection

Типы клеток Cell types	Мозжечок (центральная группа) Cerebellum (central group)	Мозжечок (зона инъекции) Cerebellum (injection area)	Мезенцефалическая ретикулярная формация MRF	Дорсо-латеральная ретикулярная формация DLRF
Размеры клеток ($M \pm SD$), мкм Cell sizes ($M \pm SD$), μm	10.2 ± 0.3/7.0 ± 0.5 8.6 ± 0.5/7.0 ± 0.5 7.0 ± 0.2/6.3 ± 0.3	11.0 ± 1.1/8.2 ± 1.3 8.8 ± 0.6/7.0 ± 0.9 7.2 ± 0.3/6.0 ± 0.7	58.6 ± 3.1/33.2 ± 2.7 41.6 ± 2.8/30.0 ± 4.5 33.2 ± 2.2/20.2 ± 5.6 19.4 ± 1.8/14.2 ± 0.3 14.3 ± 1.4/11.2 ± 2.1	12.8 ± 0.5/9.5 ± 1.2 10.5 ± 0.6/8.5 ± 1.0

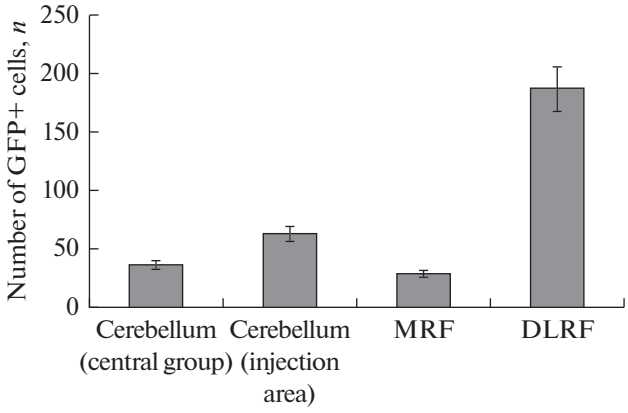


Рис. 5. Сравнительное распределение GFP-экспрессирующих клеток ($M \pm SD$) в мозжечке и ростральной части ствола мозга кеты *Oncorhynchus keta* через 10 недель после инъекции AAV.

Fig. 5. Comparative distribution of GFP-expressing cells ($M \pm SD$) in the cerebellum and rostral part of brainstem of chum salmon *Oncorhynchus keta* 10 weeks after the injection of AAV.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования показали, что AAV может эффективно трансдуцироваться в клетках мозга кеты. При различных сроках инкубации вирусного вектора GFP-экспрессирующие клетки обнаруживались как вблизи зоны инъекции, так и в удаленных от инъекции областях, куда, очевидно, вектор доставлялся с помощью внутриклеточного транспорта. В настоящее время механизмы аденовирусной транспортировки до конца не ясны [16]. В исследованиях вентральной тегментальной области (VTA) млекопитающих, получавших инъекции различных серотипов AAV, было установлено, что после долговременной экспозиции вектора (1 месяц и более) вирусные частицы выявлялись в антероградных и ретроградних проекциях VTA [16] и вдоль проводящих путей [17]. При однократных инъекциях AAV-1, AAV-9 или AAV-Rh.10 обнаруживалась экспрессия кДНК лизосомального фермента β-глюкуронидазы, что приводило к переносу аденовирусного генома в области дистальной проекции VTA [18]. Кроме того, в некоторых случаях вектор способен самостоятельно транспортироваться по нейрональным путям [19, 20]. Это приводит к доставке AAV даже на очень удаленные расстояния в мозгу, показывая таким образом, что два транспортных механизма способны работать синергетически.

В наших исследованиях на кете краткосрочная (4 дня) экспозиция AAV в теленцефалон приводила в основном к трансдукции вирусных генов в нейроны, прилежащих к области инъекции, хотя GFP-экспрессирующие клетки обнаруживались и в более удаленных областях (Dc и Dm). Тем не менее, непродолжительный срок инкубации вектора в данном случае определял сравнительно ограниченный паттерн экспрессии репортерных генов в теленцефалоне кеты.

При более долгосрочной (8 дней) экспозиции AAV в мозжечке и мезенцефалоне мы наблюдали более обильное биораспределение трансгенов в области инъекции, при котором количество GFP-экспрессирующих клеток достоверно ($p < 0.05$) превышало таковое в теленцефалоне (рис. 7). В данном варианте эксперимента GFP-экспрессирующие клетки были обнаружены в удаленных проекционных областях – за-

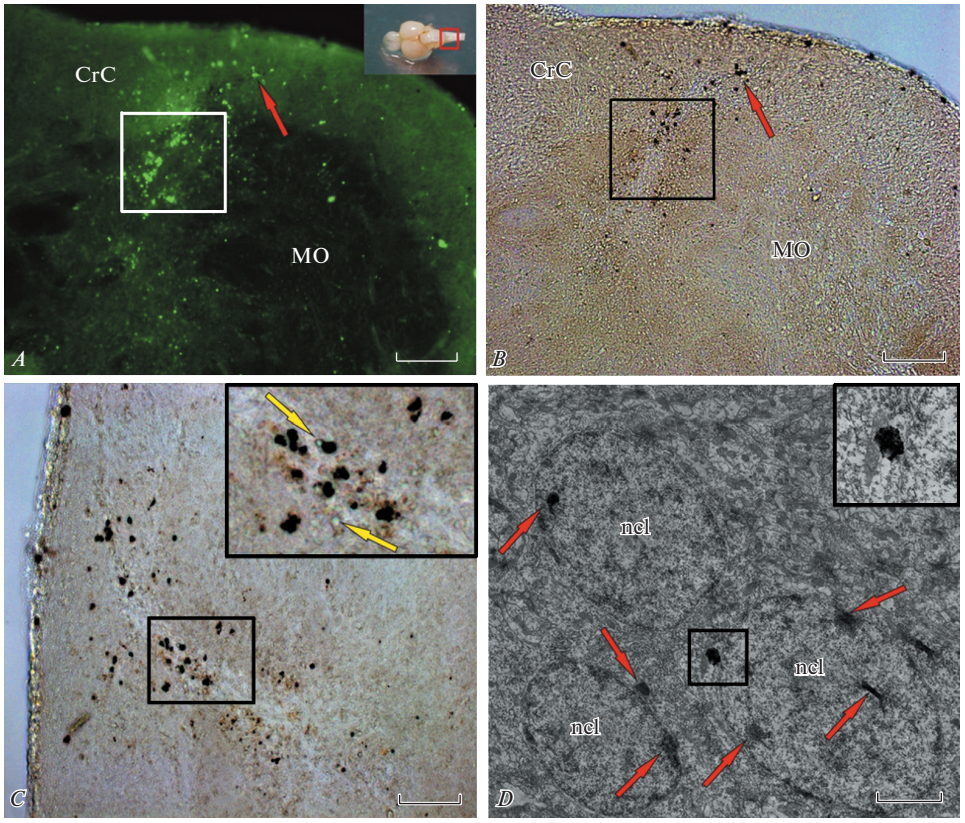


Рис. 6. Экспрессия репортерных генов в продолговатом мозга кеты *Oncorhynchus keta* через 10 недель после инъекции AAV. *A* – GFP-экспрессирующие клетки (красная стрелка) в области *crista cerebellaris*, в белом квадрате скопление трансгенных клеток; MO – продолговатый мозг, CrC – мозжечковый крест. *B* – срез мозга (на A) в режиме фазового контраста, в черном квадрате скопление трансгенных клеток. *C* – увеличенный фрагмент мозга, содержащий скопления аденовирусных частиц (на *B*), на врезке (левый верхний угол) показаны нейроны (желтые стрелки). *D* – ультраструктурная организация фрагмента *crista cerebellaris,* в квадрате показано гранулосодержащее скопление аденовирусных частиц (увеличенный фрагмент на врезке), красными стрелками показаны скопления различной плотности вирусных капсидов внутри ядер (ncl) клеток и межклеточном пространстве. *A* – флуоресцентная микроскопия, *B*, *C* – фазово-контрастная микроскопия, *D* – трансмиссионная электронная микроскопия. Масштабный отрезок: *A*, *B* – 200 мкм, *C* – 100 мкм, *D* – 2 мкм.

Fig. 6. Expression of reporter genes in the *medulla oblongata* of chum salmon *Oncorhynchus keta* 10 weeks after AAV injection. *A* – GFP-expressing cells (red arrow) in the region of *crista cerebellaris*, in a white square the accumulation of transgenic cells; MO – *medulla oblongata*, CrC – *crista cerebellaris*. *B* – brain section (on A) in phase contrast mode, in a black square accumulation of transgenic cells. *C* – an enlarged fragment of the brain containing clusters of AAV particles (on B), neurons (yellow arrows) are shown in the inset (upper left corner). *D* – ultrastructural organization of the *crista cerebellaris* fragment; the granule-containing cluster of AAV particles (enlarged fragment in the inset) is shown in the square; red arrows show clusters of different density of viral capsids inside the cell nuclei (ncl) and intercellular space. *A* –fluorescence microscopy, *B*, *C* – phase contrast microscopy, *D* – transmission electron microscopy. Scale bar: *A*, *B* – 200 microns, *C* – 100 microns, *D* – 2 microns.

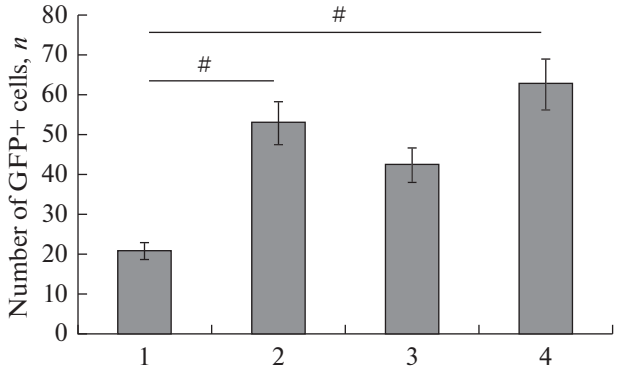


Рис. 7. Сравнительное соотношение GFP-экспрессирующих клеток ($M \pm SD$) в области инъекции AAV. По оси абсцисс: 1 – через 4 дня, теленцефалон; 2 – через 8 дней, мозжечок; 3 – через 8 дней, оптический тектум; 4 – через 10 недель, мозжечок ($n = 4$ в каждой группе; # – значимые межгрупповые отличия). Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA).

Fig. 7. Comparative ratio of GFP-expressing cells ($M \pm SD$) in the area of AAV injection. On the absicissa axis: 1 – after 4 days, telencephalon; 2 – after 8 days, the cerebellum; 3 – after 8 days; the optical tectum; 4 – after 10 weeks, the cerebellum ($n = 4$ in each group; # – significant intergroup differences). One-way analysis of variance (ANOVA).

слонке, MRF и базальном тегментуме, что, очевидно, свидетельствует о внутриклеточном перемещении вирусных частиц с помощью антероградного транспорта.

Исследования долговременной (10 нед.) экспозиции AAV после инъекции в мозжечок кеты показало обширное распространении GFP-экспрессирующих клеток в DLRF (рис. 5). В области инъекции в мозжечок было выявлено относительно небольшое количество GFP-экспрессирующих клеток по сравнению с 8-дневным периодом (рис. 7). Наличие обширной популяции клеток, содержащих трансгены в составе DLRF, свидетельствует об интенсивном распространении AAV в составе мозжечковых ножек, по которым, очевидно, вектор с помощью аксонального транспорта был доставлен в дорсальные слои *crista cerebellaris*. Исследование в режиме фазового контраста показало наличие большого количества темных плотных вирусных частиц в данной области мозга кеты. Данные трансмиссионной электронной микроскопии показали скопления различной плотности вирусных капсидов внутри ядер клеток ретикулярной формации и межклеточном пространстве, где эти частицы были представлены в виде эписом. В литературе, описывающей исследования с вирус-опосредованной доставкой трансгенов в нервную ткань, в основном, сделан акцент на описании внутриклеточных событий [2, 3]. Тем не менее, полученные на кете данные подтверждают диффузный способ распространения AAV [1], в том числе и в межклеточном пространстве, что является интересным и значимым наблюдением. Таким образом, долговременная экспозиция AAV в мозжечке и ретикулярной формации ствола кеты не вызывала заметных токсических эффектов при достаточно интенсивном распространении вирусных частиц в мозге животного, что соответствует предположению о низкой токсичности аденоассоциированных вирусных векторов для мозга рыб [11]. У животных в возрасте 2 лет в каудальных отделах мозга – мозжечке и продолговатом мозге – уже достаточно хорошо развиты проекционные двигательные системы нисходящих и восходящих проводящих путей в составе ретикулярной формации ствола. Наличие такой развитой нейрональной и проводящей инфраструктуры обеспечивает возможность для эффективного распространения вирусных частиц с помощью антеро-/ретроградного

транспорта, что многократно повышает эффективность использования аденовирусных векторов для исследования экспрессии специфических генов в ЦНС лососевых рыб. Ранее аденовирусные векторы были использованы лишь в культуре клеток рыб [11, 12] и других тканевых системах рыб [3, 13, 14]. Исследования на эмбрионах данио показало, что использование аденовирусов, содержащих усиленный зеленый флуоресцентный протеин (Ad-EGFP) вызывает довольно высокую смертность в раннем постэмбриональном периоде, что, вероятно, объясняется накопительными цитотоксическими эффектами [13]. Результаты использования AAV на различных отделах мозга 2-летней кеты при краткосрочных и долгосрочных временных интервалах свидетельствуют об эффективном распространении трансгенов в клетках ЦНС *in vivo* и низкой цитотоксичности используемых аденоассоциированных векторов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ННЦМБ ДВО РАН (госконтракт № 120k-19 от 11.14.2019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wallace D.J., Meyer zum Alten Borgloh S., Astori S., Yang Y., Bausen M., Kügler S.* Single-spike detection in vitro and in vivo with a genetic $Ca2^{+}$ sensor. Nat. Methods. 5: 797–804. 2008. https://doi.org/10.1038/nmeth.1242
2. *Zirger J.M., Puntel M., Bergeron J., Wibowo M., Moridzadeh R., Bondale N., Barcia C., Kroeger K.M., Liu C., Castro M.G.* Immune-mediated loss of transgene expression from virally transduced brain cells is irreversible, mediated by IFNγ, perforin, and TNFα, and due to the elimination of transduced cells. Mol. Ther. 20: 808–819. 2012.
3. *Kawasaki T., Saito K., Mitsui K., Ikawa M., Yamashita M., Taniguchi Y., Takeda S., Mitani K., Sakai N.* Introduction of a foreign gene into zebrafish and medaka cells using adenoviral vectors. Zebrafish. 6: 3. 2009. doi: 10.1089/zeb.2009.0596
4. *Benko M., Harrach B.* Molecular evolution of adenoviruses. In: Current Topics in Microbiological and Immunology. *Doerfler W., Böhm P.* (Eds.). Berlin. Springer. V. 272. 4–35. 2003.
5. *Kovácsa G.M., LaPatrab S.E., D'Halluinc J.C., Mária Benko*. Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus. Virus Res. 98: 27–34. 2003.
6. *Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science. 275: 1320–1323. 1997.
7. *Palmer D.J., Ng P.* Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. Hum. Gene Ther. 6: 1–16. 2005.
8. *Ohbayashi F., Balamotis M.A., Kishimoto A., Aizawa E., Diaz A., Hasty P.* Correction of chromosomal mutation and random integration in embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 13628–13633. 2005.
9. *Suzuki K., Mitsui K., Aizawa E., Hasegawa K., Kawase E., Yamagishi T.* Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 13781–13786. 2008.
10. *Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R., Hirata R.K., Hankenson K.D., Pace J.M.* Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. Science. 303: 1198–1201. 2004.
11. *Overturf K., LaPatra S., Renolds P.N.* The effectiveness of adenoviral vectors to deliver and express genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Diseases. 26: 91–101. 2003.
12. *Rainbow A.J., Zacal N.J.* Expression of an adenovirus encoded reporter gene and its reactivation following UVC and oxidative damage in cultured fish cells. Int. J. Radiat. Biol. 84(6): 455–466. 2008.
13. *Gulías P., Guerra-Varela J., Gonzalez-Aparicio M., Ricobaraza A., Vales A., Gonzalez-Aseguinolaza G., Hernandez-Alcoceba R., Sánchez L. Danio rerio* as model organism for adenoviral vector evaluation. Genes. 10: 1053. 2019. https://doi.org/10.3390/genes10121053
14. *Suehiro Y., Kinoshita M., Okuyama T., Shimada A., Naruse K., Takeda H., Kubo T, Hashimoto M., Takeuchi H.* Transient and permanent gene transfer into the brain of the teleost fish medaka

(*Oryzias latipes*) using human adenovirus and the Cre-loxP system. FEBS Letters. 584: 3545–3549. 2010.

15. *Gao G., Qu G.,Burnham M. S., Huang J.,Chirmule N., Joshi B.,Yu Q.C., Marsh J.A., Conceicao C.M., Wilson J.M.* Purification of recombinant adenoassociated virus vectors by column chromatography and its performance *in vivo*. Hum. Gene Ther. 11: 2079–2091. 2000.
16. *Cearley C.N., Wolfe J.H.* A single Injection of an adenoassociated virus vector into nuclei with divergent connections results in widespread vector distribution in the brain and global correction of a neurogenetic disease. J. Neurosci. 27(37): 9928–9940. 2007.
17. *Luca T., Givogri M.I., Perani L., Galbiati F., Follenzi A, Naldini L., Bongarzone E.R.* Axons mediate the distribution of arylsulfatase A within the mouse hippocampus upon gene delivery. Mol. Ther. 12: 669–679. 2005.
18. *Dodge J.C., Clarke J., Song A., Bu J., Yang W., Taksir T.V., Griffiths D., Zhao M.A., Schuchman E.H., Cheng S.H., O'Riordan C.R., Shihabuddin L.S., Passini M.A., Stewart G.R.* Gene transfer of human acid sphingomyelinase corrects neuropathology and motor deficits in a mouse model of Niemann-Pick type A disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 17822–17827. 2005.
19. *Passini M.A., Lee E.B., Heuer G.G., Wolfe J.H.* Distribution of a lysosomal enzyme in the adult brain by axonal transport and by cells of the rostral migratory stream. J. Neurosci. 22: 6437–6446. 2002.
20. *Hennig A.K., Levy B., Ogilvie J.M., Vogler C.A., Galvin N., Bassnett S., Sands M.S.* Intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in specific areas of the CNS in mucopolysaccharidosis VII mice. J. Neurosci. 23: 3302–3307. 2003.

The Efficacy of Gene Delivery into Fish Brain Cells Using the Recombinant Adeno-Associated Mouse Hippocampal Viruses

E. V. Pushchina[a, b, *], Y. N. Alexandrova[a], A. A. Varaksin[a], and D. K. Obukhov[c]

[a] *Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, Russia*

[b] *Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*

[c] *St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: puschina@mail.ru*

Viral vectors constitute a flexible system that can efficiently deliver an exogenous gene to a variety of target cells and, thus, is a potentially powerful tool for genetic manipulation. To deliver the viral genes, an injection of recombinant adeno-associated viruses was performed according to the Wallace method [1]. The use of recombinant adeno-associated vectors allows viral particles to diffuse relatively easily from the injection area and quickly reproduce themselves in the brain cells. The work objective was to study the effectiveness of infecting various brain regions of chum salmon *Oncorhynchus keta* aged 2 years old with mammalian viral vectors with a short-term (4 and 8 days) and a longer-term (10 weeks) time intervals with subsequent ultrastructural analysis of the nerve tissue in the injection area. We have found that the mouse hippocampal AAV-1 incorporated *in vivo* brains of a chum salmon *Oncorhynchus keta*. Injection of an adeno-associated vector into various areas of the brain was made: telencephalon, cerebellum, mesencephalic tectum, and tegmentum of *Oncorhynchus keta,* and led to the expression of the reporter genes in pallial (Dd and Dl) regions of the telencephalon, the periventricular region of the masencephalon, in the dorsal part of the brain stem, and in the cerebellum (*valvula* and *corpus cerebellum*). Using fluorescence microscopy, we have shown that the presence of green fluorescence is associated with the expression of green fluorescence protein (GFP) in chum salmon cells. The ultrastructural analysis confirmed the presence of subcellular virus particles in the cells of chum salmon brain and intercellular space, which indicates the ability of the adeno-associated vector to diffuse in the nervous tissue of the chum salmon brain.

Keywords: adenovirus, high-capacity adenoviral vector, Oncorhynchus keta, tectum, tegmentum, cerebellum, medulla oblongata

ЦИТИРОВАТЬ:

Пущина Е.В., Александрова Я.Н., Вараксин А.А., Обухов Д.К. Эффективность доставки генов в клетки мозга рыб при помощи рекомбинантных аденоассоциированных вирусов гиппокампа мыши. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(12): 1571–1584.

DOI: 10.31857/S0869813920110096

TO CITE THIS ARTICLE:

Pushchina E.V., Alexandrova Y.N., Varaksin A.A., Obukhov D.K. The Efficacy of Gene Delivery into Fish Brain Cells Using the Recombinant Adeno-Associated Mouse Hippocampal Viruses. Russian Journal of Physiology. 106(12): 1571–1584.

DOI: 10.31857/S0869813920110096