

СОДЕРЖАНИЕ

Том 38, номер 3, 2021

Обзоры

Реорганизация актинового матрикса как фактор пресинаптической пластичности <i>И. В. Кудряшова</i>	195
Молекулярно-клеточные механизмы пластических перестроек, вызванных обогащением среды. Влияние на обучение и память <i>Г. А. Григорьян</i>	205
Функциональная протеомика. Новые подходы в исследовании заболеваний мозга <i>О. А. Гомазков</i>	221
Нейростероиды и депрессивные состояния <i>Д. А. Жуков, Е. П. Виноградова</i>	228

Экспериментальные работы

Изучение модификации лекарственного центра I сывороточного альбумина человека гипохлоритом натрия методом разрешенной во времени флуоресцентой спектроскопии <i>Т. И. Сырейщикова, Н. В. Смолина, М. Г. Узбеков, В. И. Бриллиантова, Е. Д. Сыромятникова, Г. Е. Добрецов</i>	235
Субхроническое введение пептидных препаратов ноопепт и семакс увеличивает плотность ГАМК _A -рецепторов в мозге мышей BALB/c <i>Е. В. Васильева, А. А. Абдуллина, Г. И. Ковалёв</i>	242
Оксид азота тормозит функциональную активацию серотониновой системы медиальной префронтальной коры при формировании страха и уменьшает его генерализацию <i>Н. Б. Саульская, М. А. Бурмакина, Н. А. Трофимова</i>	249
Оверэкспрессия фактора роста нервов в гиппокампе вызывает поведенческие изменения у крыс с холинергическим дефицитом, индуцированным 192IgG-сапорином <i>Ю. В. Добрякова, М. И. Зайченко, Ю. С. Спивак, М. Ю. Степаничев, В. А. Маркевич, А. П. Большаков</i>	257
Влияние умеренной гипотермии на каталитические характеристики синаптической ацетилхолинэстеразы при субтотальной ишемии головного мозга у крыс <i>Н. К. Кличханов, А. М. Джафарова</i>	267
Неоднозначные эффекты длительного приема ТС-2153 — ингибитора стриатумспецифичной протеинтирозинфосфатазы STEP — на модели спорадической формы болезни Альцгеймера <i>Е. А. Рудницкая, А. О. Бурняшева, Т. А. Козлова, Н. А. Муралева, Д. В. Телегина, Т. М. Хоменко, К. П. Волчо, Н. Ф. Салахутдинов, Н. Г. Колосова</i>	278

Contents

Vol. 38, no. 3, 2021

Review Articles

Actin Rearrangement as a Factor of Presynaptic Plasticity <i>I. V. Kudryashova</i>	195
The Molecular-Cellular Mechanisms of Plastic Restructuring Produced by the Enriched Environment. The Effects on Learning and Memory <i>G. A. Grigoryan</i>	205
Functional Proteomics. New Approaches in Researching Brain Diseases <i>O. A. Gomazkov</i>	221
Neurosteroids and Depression <i>D. A. Zhukov and E. P. Vinogradova</i>	228

Experimental Articles

The Study of Modification of the Drug Center I of Human Serum Albumin by Sodium Hypochlorite by the Method of Time Resolved Fluorescent Spectroscopy <i>T. I. Syreishchikova, N. V. Smolina, M. G. Uzbekov, V. V. Brilliantova, E. D. Syromyatnikova, and G. E. Dobretsov</i>	235
The Sub-Chronic Administration of Noopept and Semax Peptides Increases the Density of Cortical GABA _A -receptors in BALB/c Mice <i>E. V. Vasileva, A. A. Abdullina, and G. I. Kovalev</i>	242
Nitric Oxide Inhibits the Functional Activation of the Medial Prefrontal Cortex Serotonin System during Fear Formation and Decreases Fear Generalization <i>N. B. Saulskaya, M. A. Burmakina, and N. A. Trofimova</i>	249
Overexpression of Nerve Growth Factor in the Hippocampus Induces Behavioral Changes in Rats with 192IgG-Saporin-Induced Cholinergic Deficit <i>Yu. V. Dobryakova, M. I. Zaichenko, Yu. S. Spivak, M. Yu. Stepanichev, V. A. Markevich, and A. P. Bolshakov</i>	257
Effect of Mild Hypothermia on the Catalytic Characteristics of Synaptic Acetylcholinesterase during Incomplete Global Cerebral Ischemia in Rats <i>N. K. Klichkhanov and A. M. Dzhaifarova</i>	267
Ambiguous Effects of Prolonged Dietary Supplementation with a Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor, TC-2153, on a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease <i>E. A. Rudnitskaya, A. O. Burnyasheva, T. A. Kozlova, N. A. Muraleva, D. V. Telegina, T. M. Khomenko, K. P. Volcho, N. F. Salakhutdinov, and N. G. Kolosova</i>	278

УДК 612.822.3

РЕОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО МАТРИКСА КАК ФАКТОР ПРЕСИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

© 2021 г. И. В. Кудряшова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.03.2021 г.

После доработки 05.04.2021 г.

Принята к публикации 07.04.2021 г.

В обзоре изложены современные представления о механизмах участия актина в координации пресинаптических функций. Помимо участия актинового цитоскелета в поддержании пространственной организации структуры синапса, к функциям актина относят транспорт и заякоривание необходимых для сигналинга белков, актиновый цитоскелет может ограничивать их латеральную диффузию, способствуя образованию функционально активных комплексов. Результаты исследований свидетельствуют о причастности актиновых филаментов пресинаптического компартмента к регуляции активности секреторного аппарата. Пресинаптический актин участвует в рециркуляции везикул, происходящая при этом реполимеризация актина зависит от условий активации. Предполагается, что деполимеризация актина может способствовать началу формирования обновленного актинового матрикса. Стабилизация этих модификаций после полимеризации актина может иметь отношение не только к постсинаптическим, но и к пресинаптическим механизмам долговременной пластичности.

Ключевые слова: пресинаптическая пластичность, консолидация, дестабилизация, реполимеризация актина, стабилизация

DOI: 10.31857/S1027813321030092

“Dynamic synapses as archives of synaptic history” (Yasui et al., 2005)

Известно, что в основе приспособительного поведения лежит образование новых нейронных ансамблей, которое сопровождается реорганизацией синаптических контактов [1, 2]. Очевидно, что при этом необходимы скоординированные модификации пресинаптического и постсинаптического компартмента. Свойства синапсов зависят от их молекулярного состава, и, прежде всего, от скелетных, стеллажных и якорных белков, которые поддерживают динамическое равновесие сигнальных и регуляторных белков [3].

РЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ АКТИНА ПРИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПОТЕНЦИАЦИИ

Одним из ключевых процессов, происходящих в синапсах при их структурно-функциональных модификациях, является реполимеризация актиновых филаментов [4, 5]. Об этом свидетельствуют исследования долговременной пластичности синапсов [6–10], основные результаты которых соответствуют изменениям в гиппокампе обучаю-

щихся животных [11, 12]. Полагают, что перепрограммирование актинового цитоскелета позволяет преодолеть устойчивое состояние синапса [13–15] и стабилизировать структурные последствия модификаций при “обучении” [2, 16].

При исследовании долговременной синаптической пластичности с использованием модели долговременной потенциации (LTP) было обнаружено, что для консолидации первичных модификаций необходима полимеризация актина [5–8, 10, 13–16]. Объясняя эти результаты, авторы предположили, что сразу после индукции образуются новые актиновые филаменты [14], которые в течение так называемой ранней фазы LTP (10–30 мин после индукции [17]) остаются неустойчивыми и легко реагируют на любые депотенцирующие сигналы [6, 8, 13, 14]. После стабилизации такие филаменты, по всей вероятности, приобретают защиту от действия дестабилизирующих факторов и, в частности тех, которые приводят к деполимеризации актина [10, 12–15, 18].

Подавляющее большинство этих публикаций основное внимание уделяют постсинаптическому компартменту [19–22]. В частности, было обнаружено, что образование F-актина усиливается при индукции LTP, что обеспечивает рост шипиков, который наблюдается в фазе консолидации

* Адресат для корреспонденции: 117485 Россия, Москва, ул. Бутлерова, 5а, e-mail: iv_kudryashova@mail.ru.

[7–9, 15, 16, 18, 22]. Вместе с тем, авторы одной из цитируемых работ обращают внимание на сходство структурных модификаций шипиков с поведением конусов роста аксонов [16]. Таким образом, не исключено, что полимеризация актина может иметь отношение и к пресинаптической потенциации.

ЛТР И ПРЕСИНАПТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ

Очевидно, что после всех преобразований, связанных с реорганизацией постсинаптического компартмента, для образования полноценного контакта необходима сопряженность структурных модификаций пре- и постсинапса [23–26]. Известно, что пресинаптическая и постсинаптическая ЛТР может развиваться в одних и тех же синапсах [27–29], что типично для некоторых отделов гиппокампа [30–33]. К сожалению, эта область исследования представлена лишь немногочисленными исследованиями, косвенно свидетельствующими о влиянии пресинаптических модификаций на процесс консолидации [23, 34–36]. Вполне вероятно, что пресинаптические модификации, так же, как и в постсинапсе, тесно связаны с реорганизацией актинового цитоскелета [24], а заякоривание актиновыми филаментами всех наиболее известных молекул клеточной адгезии может способствовать согласованным модификациям пресинаптического и постсинаптического компартмента [25]. Очевидно, что от этих механизмов в равной степени зависят структурно-функциональные особенности и пресинаптического, и постсинаптического компартмента.

ФУНКЦИИ ПРЕСИНАПТИЧЕСКОГО АКТИНА. ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ПОДХОД

Литературные данные об участии актина в регуляции пресинаптических функций представлены преимущественно работами, использующими в качестве объекта исследования беспозвоночных животных [37–41]. Пресинаптический компартмент центральной нервной системы позвоночных животных в силу некоторых методических ограничений менее доступен для исследования. Однако консервативность организации секреторного аппарата, по мнению большинства авторов, позволяет предполагать сходство молекулярных механизмов пресинаптической пластичности [40, 42, 43]. В частности, одним из общих для всех синапсов компонентов пресинаптического компартмента является актин [38, 44–46]. Его роль в регуляции эффективности синаптического проведения подтверждается в экспериментах на культуре центральных нейронов позвоночных животных, в том числе гиппокампа [3, 4, 46–50].

АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ ПРЕСИНАПСА

В пресинаптическом компартменте актиновые филаменты образуют хорошо выраженный слой, выстилающий изнутри зону синаптического контакта. Кроме того, обогащенный актином цитоматрикс окружает активную зону пресинапса [37, 38, 46], причем часть филаментов соседствует с везикулами активной зоны [37, 38, 47]. Так же, как и в других клеточных компартментах, актиновые филаменты пресинапса образуют структурный каркас, удерживающий участвующие в регуляции секреции белки. Кроме того, образованные F-актином филаменты отвечают за транспорт и заякоривание везикул и участвующих в регуляции секреции белков в активную зону пресинапса [4, 39, 51–54]. В дополнение к этому, актиновый цитоскелет может ограничивать латеральную диффузию белков [46, 54–56], тем самым способствуя образованию функционально активных комплексов.

Исследования на простых нервных системах и культуре нервных клеток, в том числе и гиппокампа, свидетельствуют, что актин участвует в обновлении кластеров, эндоцитозе и рециркуляции везикул [4, 37, 38, 47, 48, 54, 57–59]. Экспериментальной основой этих представлений являются исследования, демонстрирующие основополагающую роль актина в формировании и дальнейшем развитии созревающих синапсов [60].

ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ АКТИНА ЗРЕЛЫХ СИНАПСОВ

Не так очевидны результаты исследования функций пресинаптического актина зрелых синапсов. С возрастом секреторный аппарат становится менее подверженным действию ограничивающих целостность актиновых филаментов препаратов, и в стационарных условиях не всегда удается обнаружить нарушения синаптической передачи после их аппликации [46, 48, 50]. На основании наблюдений за поведением созревающих синапсов было высказано предположение, что актин постепенно теряет связь с регуляторными функциями и в полностью созревших синапсах используется только в качестве цитоскелета [46]. Полагают, что неоднозначность или отсутствие эффектов может объясняться простой суммой нарушений двух противоположных функций актинового цитоскелета [4, 49], который в качестве барьера ограничивает секрецию [47], но при этом способствует мобилизации синаптических везикул. Не исключено, однако, что после созревания и стабилизации центральных синапсов высших позвоночных животных механизмы регуляции пресинаптического высвобождения медиатора становятся в той или иной степени независимыми от актинового цитоскелета.

Действительно, при созревании синапсы приобретают новые качества, и это, по-видимому, затрудняет выявление актин-зависимых механизмов. Главными детерминантами, определяющими вероятность выброса медиатора, становятся активность пресинаптических кальциевых каналов и специфический паттерн экспрессии входящих в состав SNARE комплекса везикулярных белков, по-разному реагирующих на входящий в пресинаптическое окончание кальций [61–64]. Аналогично, стелажные функции актина все больше замещаются другими стелажными белками [46, 60], хотя некоторые из них, в частности белки семейства PSD-95 или Bassoon, продолжают взаимодействовать с актином [47, 60].

История на этом не заканчивается и при обсуждении пресинаптических механизмов долговременной пластичности заслуживает внимания тот факт, что и после созревания центральных синапсов позвоночных животных актин не теряет своего значения, при необходимости включаясь в регуляцию секреции медиатора. Далее изложены аргументы, предполагающие активное участие пресинаптического актина в модификациях эффективности синапсов.

Каждый пресинаптический бутон заполнен везикулами, но только их небольшая часть готова к немедленному экзоцитозу [63]. Хотя четкой границы не существует, при аналитическом описании всего разнообразия механизмов, вовлеченных в регуляцию пресинаптических функций, их принято относить к пулу готовых к высвобождению везикул (readily releasable pool, RRP). Величина этого пула и вероятность выброса каждой из везикул являются ключевыми факторами, от которых и зависит эффективность синапса [63, 65, 66]. Число готовых к высвобождению везикул непостоянно и контролируется целой системой внутриклеточных посредников, включая актин [62, 66].

УЧАСТИЕ АКТИНА В ПОДДЕРЖАНИИ ПУЛА ГОТОВЫХ К ВЫСВОБОЖДЕНИЮ ВЕЗИКУЛ

С одной стороны, взаимодействие синаптических везикул резервного пула с актиновыми филаментами ограничивает их перемещение непосредственно в область активной зоны [45, 60]. С другой стороны, везикулы RRP пула, по некоторым данным, также могут взаимодействовать с актиновыми филаментами [60]. Не исключено, такие филаменты могут иметь отношение к удерживанию синаптических везикул в активной зоне, хотя большинство исследователей склоняются к тому, что их появление в активной зоне может быть связано с транспортной функцией актина. Так или иначе, присутствие актиновых филаментов скорее способствует, чем препятствует

ет большей концентрации синаптических везикул в активной зоне [60].

Фармакологическое разрушение актиновых филаментов приводит к уменьшению пула доступных для секреции везикул, хотя, по мнению авторов, наиболее существенной для этого эффекта мишенью являются филаменты, расположенные латеральнее активной зоны [37]. Объясняя этот факт, авторы предположили, что актиновые филаменты имеют отношение к транспорту везикул в ту зону, где происходит экзоцитоз. Интересно, что баланс между взаимодействующими с синаптическими везикулами и расположенными более латерально актиновыми филаментами непостоянен и зависит от синаптической активности [37]. Эту точку зрения разделяют авторы некоторых других работ [38, 47, 62].

В культуре нейронов гиппокампа объем RRP зрелых синапсов также заметно сокращается на фоне ингибитора полимеризации актина цитохалазина D [50], поэтому вполне вероятно, что по сути своей тот же механизм мобилизации синаптических везикул, за исключением некоторых особенностей молекулярного обеспечения, может сохраняться в течение всей жизни. В том числе, предполагается участие пресинаптического актина в прайминге так называемых быстрых везикул [53, 62]. К тому же, актиновые филаменты являются структурным каркасом, обеспечивающим поддержание миозина [16, 67], также участвующего в рециркуляции везикул [47, 62].

Готовность везикул к экзоцитозу зависит не только от интенсивности входящего кальция, но и от степени их удаленности от активных в данный момент каналов [68–70]. Исследование условий активации возбудимых клеток показало, что взаимодействие актиновых филаментов с $\text{Ca}_v\beta$ субъединицами кальциевых каналов имеет отношение к регуляции транспортных функций [71]. В пресинаптических окончаниях такое взаимодействие может способствовать направленному транспорту везикул непосредственно к источнику сигнала [4, 49, 72], и, соответственно, восстановлению пула готовых к употреблению везикул [50]. Этот механизм особенно необходим в условиях повышенной синаптической активности. Более того, в экспериментах на культуре нейронов гиппокампа было обнаружено, что RRP не только легче восстанавливается, но и растет при увеличении экспрессии ассоциированной с актином $\text{Ca}_v\beta$ субъединицы, что сопровождается увеличением спонтанной и вызванной секреции [50]. Этот эффект блокируется цитохалазином D [50].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКТИНА С СИНАПСИНОМ ПРИ РЕЦИРКУЛЯЦИИ ВЕЗИКУЛ

Участие актина в подготовке секреторного аппарата к экзоцитозу осуществляется в тесном взаимодействии с синапсином [37, 73]. Синапсины относятся к семейству фосфопротеинов, непосредственно ассоциированных с синаптическими везикулами и актином [37, 73, 74]. Развитию представлений о механизмах совместного участия синапсинов и актина в мобилизации синаптических везикул немало способствовали исследования *in vitro* [37]. Взаимодействие синапсинов с актином регулируется их фосфорилированием [73, 75]. Дефосфорилированный синапсин прочно связан с молекулами актина, но сразу же отсоединяется от них при фосфорилировании [73, 75]. Это освобождает везикулы, делая их доступными для экзоцитоза [37]. Вслед за этим синапсин направляется в зону эндоцитоза, где вступает во взаимодействие с молекулами мономерного G-актина, что стимулирует образование нового актинового матрикса и его ассоциацию с восстановленными после эндоцитоза везикулами [37, 38].

К наиболее изученным фосфорилирующим синапсин протеинкиназам относится СаМКП [76]. В результате такого фосфорилирования увеличивается пул готовых к экзоцитозу везикул [76, 77]. МАРК фосфорилирует синапсин по другим сайтам, при этом основной эффект разобщения с актиновыми филаментами не изменяется, за исключением некоторых функциональных особенностей. В частности, сайты фосфорилирования МАРК, которые имеют отношение к регуляции секреции, в отличие от сайтов СаМКП, находятся в фосфорилированном состоянии в обычных условиях и дефосфорилируются кальцинеином при деполимеризации пресинаптического окончания [78]. Таким образом, МАРК и кальцинеин, скорее всего, задействованы на стадии рециркуляции везикул [38]. Ингибиторы МАРК ограничивают фосфорилирование синапсина и это приводит к снижению секреции [78].

В зрелых синапсах главной функцией синапсина является кластеризация рецепторов и восстановление пула доступных для экзоцитоза везикул [37, 38]. Благодаря взаимодействию с синапсином, актиновые филаменты отвечают, главным образом, за образование и поддержание резервного пула везикул [45, 60, 79]. Дефицит синапсинов приводит к истощению запасов синаптических везикул и ухудшению их рециркуляции [79, 80]. При этом обедняется латеральный актиновый матрикс и уменьшается число везикул в кластере [38]. Этот факт наглядно демонстрирует, что синапсин, по всей вероятности, оказывает влияние на опосредованные актином механизмы рециркуляции везикул. Полагают, что влияние этого механизма

распространяется прежде всего на везикулы резервного пула, а содержание везикул в активной зоне, вероятно, в меньшей степени зависит от синапсинов [80]. Интересно, что такое же снижение числа везикул обнаружено при дефиците стабилизирующих F-актин белков [81].

ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЙ АКТИН И ВЕРОЯТНОСТЬ ВЫБРОСА МЕДИАТОРА

Пресинаптический потенциал действия стимулирует вход кальция и экзоцитоз, причем число участвующих в экзоцитозе везикул, зависит не столько от числа готовых к экзоцитозу везикул, сколько от вероятности выброса медиатора [82], тем более, если сравнивать между собой разные синапсы. После аппликации приостанавливающего процесс полимеризации актина препарата на культуру нейронов гиппокампа, авторы обнаружили множественные эффекты, в том числе увеличение амплитуды вызываемых стимуляцией пресинаптических входов синаптических потенциалов, которое сопровождалось снижением фасилитации при парной стимуляции (PPF) [47]. PPF тест часто используют для определения вероятности выброса медиатора, и снижение PPF может быть признаком ее увеличения [65, 83].

В настоящее время не существует достаточно обоснованных представлений о механизмах влияния актина на вероятность выброса медиатора. Одним из возможных объяснений может быть зависимость вероятности выброса от величины RRP пула [84, 85]. Действительно, в условиях снижения величины входящего кальциевого тока, которое наблюдается, в частности, при деполимеризации актина [86], синаптическая депрессия сопровождается увеличением PPF [87].

Разнообразие эффектов при опустошении депо не всегда подтверждает такую закономерность [88, 89]. Тем не менее, сама возможность увеличения вероятности выброса позволяет предположить, что это может быть связано с истощением RRP вследствие увеличения спонтанной секреции при деполимеризации актина и ослаблении его барьерных функций. Однако маловероятно, что нарушение барьерных функций может объяснить полученные результаты. Во-первых, против этого свидетельствует увеличение амплитуды вызванных ВПСП, которое сопровождается удлинением актиновых филаментов [47]. Сами авторы считают, что барьерные функции даже улучшаются. К тому же, при аппликации цитохалазина D этот эффект не воспроизводится [47]. Что касается частоты спонтанных ВПСП, результаты не всегда совпадают и, как показано в другой работе, она может даже снижаться [48]. А главное, активирующее влияние латрукулина А на спонтанные и вызванные стимуляцией синаптические потенциалы не сопровождалось истощением RRP [47] и, следова-

тельно, вероятность выброса медиатора увеличивалась по другим, пока не очень ясным причинам. Тот факт, что введение фалоидина в постсинаптический нейрон не блокирует этот эффект латрукулина А, позволяет исключить участие постсинаптических механизмов [47]. К тому же, в этой и других работах не наблюдалось изменения амплитуды спонтанных ВПСР [47, 48]. Возможно, имеет значение расположение везикулы относительно канала [71, 90]. Известно, что синаптические везикулы, в зависимости от состава ассоциированных с ними белков, могут иметь разную вероятность выброса и эффективность пополнения медиатора [63]. В связи с этим обсуждается возможность направленного транспорта везикул с разной вероятностью выброса медиатора [61]. Экспрессия специфических маркеров могла бы обеспечить распределение везикул [91]. Авторы допускают такую возможность, хотя неизвестно, как это связано с цитоскелетом [61].

ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЙ АКТИН И КРАТКОВРЕМЕННАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ

Еще более важным свойством межнейронных взаимодействий при реализации приспособительного поведения является их участие в генерации временного паттерна активации участвующих в нем нейронов. Кратковременная синаптическая пластичность позволяет обеспечить последовательное включение нейронов, создавая пространственно-временной паттерн активации нейронного ансамбля в целом. Нейроны, слабо реагирующие на первичный сигнал, не сразу вовлекаются в реализацию функций, но фасилитация синаптических входов на какое-то время увеличивает вероятность их последующей активации. Другие, уже выполнившие свою функцию нейроны могут дальше не участвовать в реализации функций, и в активирующих их синапсах развивается кратковременная депрессия. Исследования кратковременной синаптической пластичности используют целый ряд методических подходов, одним из которых является метод парной стимуляции моносинаптических входов с разными межстимульными интервалами.

Считается, что феномен парной фасилитации (PPF) имеет преимущественно пресинаптическую природу [92] и связан со следовыми эффектами, возникающими в пресинапсе после прохождения потенциала действия, в частности, с постепенным удалением ионов кальция в течение десятков миллисекунд [93]. Число вовлекаемых в экзоцитоз везикул зависит от концентрации кальция и это определяет увеличение секреции при повторной активации на фоне остаточного кальция. Во-первых, увеличение остаточного кальция создает дополнительные сайты секреции. Во-вторых, на остаточный кальций реагируют Ca^{2+} сенсоры, в

том числе те, которые модулируют активность пресинаптических кальциевых каналов [94]. События развиваются в зависимости от того, какой из Ca^{2+} сенсоров вступает в реакцию [94–96]. Характер кратковременных модификаций зависит также от экспрессии $\text{Ca}_v\beta$ субъединиц. В частности, экспрессия $\text{Ca}_v\beta_4$ способствует PPF, а кратковременную депрессию при парной стимуляции (PPD) связывают с $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ субъединицей [97]. Активирующее влияние $\text{Ca}_v\beta_4$ прекращается после разобщения с актином [50].

Помимо основного, реакция на парную стимуляцию включает также ряд других сопутствующих механизмов, как правило, подавляющих PPF. Значимый вклад в снижение PPF вносят модификации постсинаптических рецепторов и модулирующее влияние входов другой медиаторной специфичности, преимущественно тормозных. Степень участия этих механизмов и их зависимость от актина не имеют прямого отношения к цели данного обзора и будут подробно рассмотрены в дальнейшем.

Изменение реакции при повторной активации может быть в той или иной степени связано с частичными потерями медиатора, особенно если до этого синапсы были более активны. С одной стороны, актин необходим для быстрого восстановления запасов медиатора [57, 98]. Обнаружено, что взаимодействие актина с $\text{Ca}_v\beta_4$ ускоряет восстановление пула доступных для экзоцитоза везикул [50]. В частности, от этого зависит быстрый, независимый от клатрина эндоцитоз, который происходит не больше чем за 50–100 мс по соседству с активной зоной [50]. Если объем RRP при этом увеличивается, очевидно, что это может приводить к увеличению PPF. В некоторых синапсах обнаружено, что и другие виды эндоцитоза также зависят от актина [59]. С другой стороны, из-за того, что фосфорилированный синапсин быстро связывается с F-актином, часть везикул остается за пределами активной зоны [62, 99], так что объем RRP и, соответственно, PPF уменьшается.

Необходимо отметить, что в процессе эндоцитоза с участием синапсина могут происходить отклонения, которые приводят не только к перераспределению синаптических везикул, но и к реорганизации структуры актинового матрикса. Актиновые филаменты состоят из молекул полимеризованного F-актина, но в тех же пресинаптических компартментах обнаруживается достаточно много диффузно распространенного мономерного (глобулярного) G-актина, который образуется в том числе и при рециркуляции везикул [100]. Образовавшийся G-актин вновь используется для образования F-актина и обновления цитоматрикса, а способность синапсина удерживать молекулы G-и F-актина на близком расстоянии друг от друга способствует его полимеризации

[74, 101]. Характер взаимоотношений синапсинов с актином, в том числе их “полимеризующий потенциал”, модулируется целым рядом регулируемых кальцинеирином белков [38].

Динамический баланс фосфорилированного и дефосфорилированного синапсина при разных режимах активации создает условия для постоянного обновления актиновых филаментов, что, в свою очередь, влияет на распределение ассоциированных с синапсином везикул [38]. По некоторым данным это может происходить не только в зоне эндоцитоза, но и внутри уже сформированных кластеров [38]. Вероятно, по этой причине изменение электрической активности может влиять на размер RRP [66].

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ФУНКЦИИ АКТИНА В ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

Роль актинового матрикса в регуляции секреции медиатора позволяет предположить, что его реорганизация, так же, как и в постсинапсе, может иметь отношение к пресинаптическим механизмам долговременной пластичности [4]. Наблюдения за поведением актиновых филаментов *in vitro* показывают, что большинство из них являются достаточно стабильными, другие же находятся в неустойчивом состоянии [39, 46]. Как правило, это короткие, склонные к деполимеризации филаменты, которые реагируют на подведение латрукулина А, быстро образуются и также быстро исчезают [47].

Так же, как и в постсинапсе, перераспределение пресинаптических филаментов зависит от электрической активности [38, 39, 46]. При активации плотность окружающих везикулы филаментов увеличивается за счет мобилизации из соседних областей и образования новых [38, 46]. Их увеличение в активной зоне по сравнению с состоянием покоя обнаруживается уже через 2 минуты после начала стимуляции [38]. Оказалось, что в основном нестабилен именно этот, вновь образованный F-актин [37].

Согласно развиваемым здесь представлениям, дестабилизация синапсов необходима для начала тех преобразований, которые могли бы обеспечить долговременное поддержание нового функционального состояния “обученного” синапса [2, 14, 60]. Полагают, что актин является главной мишенью для дестабилизирующих и стабилизирующих сигналов [10, 14, 17, 60]. В настоящее время неясно, связана ли ранняя стадия консолидации только с образованием новых короткоживущих филаментов [14], или же деполимеризация ранее существующих тоже необходима, как минимум, для обеспечения двигательной активности.

Не вызывает сомнения тот факт, что полимеризация и деполимеризация актина играет клю-

чевую роль в структурных изменениях пресинаптического компартмента за счет реорганизации цитоскелета [25, 102]. Вместе с тем, экспериментальных данных явно недостаточно, чтобы подтвердить возможность участия деполимеризации пресинаптического актина в дестабилизации синапсов на ранней стадии консолидации. Такая возможность не исключается благодаря наличию деполимеризующих актин регуляторных белков, реагирующих на активацию и участвующих в пресинаптической пластичности [4].

Актин-связывающий белок профилин участвует в обеспечении динамической нестабильности и реструктуризации актинового цитоскелета. Вместе с динамином и актином, с ним ассоциирован синапсин [103], что позволяет предположить его участие в эндоцитозе и рециркуляции везикул [38, 100]. Деполимеризация происходит при дефосфорилировании кофилина [104], активации миозина II [105], что может влиять на активность NMDA каналов [106]. Образованные в результате деполимеризации мономеры используются для образования новых молекул F-актина и удлинения старых. Не исключено, что при долговременной пластичности увеличение числа мономеров или их баланса с F-актином, вероятно, каким-то образом стимулирует процесс сборки и поэтому блокада миозина II ингибирует LTP [16].

После фосфорилирования кофилин инактивируется, что останавливает процесс деполимеризации и способствует дальнейшей полимеризации и росту филаментов [107]. Показано, что фосфорилирование кофилина происходит вслед за высокочастотным раздражением синаптических входов [16] и может иметь отношение к механизмам поддержания LTP в фазе стабилизации [10, 14]. К стабилизации F-актина в активной зоне пресинапса имеет отношение *riccolo* и некоторые другие регуляторные белки, функции которых связывают с обеспечением готовности синаптических везикул к экзоцитозу [62, 81, 108].

ИНГИБИТОРЫ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ И ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ АКТИНА КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ КОНСОЛИДАЦИИ

Некоторые дополнительные сведения о механизмах консолидации были получены в экспериментах с использованием ингибиторов полимеризации и деполимеризации актина. Разумеется, эксперименты с аппликацией ингибирующих или активирующих деполимеризацию и полимеризацию препаратов полностью не воспроизводят естественные условия. Ингибитор деполимеризации актина джасплакинолид проникает через клеточную мембрану [109], что в значительной степени снимает методические ограничения при исследовании функций пресинаптического актина в цен-

тральных синапсах высших позвоночных животных. Тот факт, что в поле CA1 переживающих срезов гиппокампа взрослых крыс LTP снижается, если тетанизация производится на фоне джасплакинолида, свидетельствует в пользу гипотезы о необходимости фазы дестабилизации, тем более, что индукция и самая ранняя фаза LTP не нарушались [14]. В зависимости от поступающих сигналов, LTP, как известно, может угашаться, а аппликация джасплакинолида предотвращает депотенциацию [13–15, 110]. Вполне вероятно, что джасплакинолид может улучшать поддержание LTP и как активатор полимеризации [109, 111].

Отсутствие данных не позволяет полностью перенести эти рассуждения на пресинаптические механизмы долговременной пластичности. Существенно, что в цитируемой выше работе джасплакинолид не препятствует увеличению F-актина в шипиках после индукции LTP [14]. Поэтому пресинаптические механизмы влияния джасплакинолида на развитие LTP можно считать вполне вероятными. Некоторые эффекты джасплакинолида, которые были получены при других режимах стимуляции, в норме не вызывающих долговременных модификаций, лишь косвенно свидетельствуют о возможности его влияния на пресинаптическую пластичность.

В культуре нейронов гиппокампа сочетание стандартной стимуляции с аппликацией джасплакинолида приводит к увеличению числа активных пресинаптических бутонов [48]. Наши предварительные данные показывают, что в гиппокампе взрослых крыс на фоне джасплакинолида PPF может снижаться, но только, так же, как и пресинаптическая LTP, при исходно низкой вероятности выброса медиатора [14]. Можно предположить, что джасплакинолид, как активатор полимеризации, стабилизирует последствия тех модификаций, которые направлены на восстановление нормального уровня синаптической активности [112, 113].

Хотя и в отсутствие дополнительной стимуляции джасплакинолид сам по себе способен провоцировать распространение актина в пресинаптический компартмент [46], что может объяснять наблюдаемое при этом увеличение секреции [39, 48]. Тем более, что применение другого ингибитора деполимеризации фаллоидина вызывает пресинаптическую депрессию [39]. Такая депрессия не обязательно связано с нарушениями секреторного аппарата. Введенный в пресинапс фаллоидин не влияет на генерацию пресинаптического потенциала действия, но при этом снижается величина кальциевого сигнала и постсинаптический ток [114]. Таким образом, в основе данной пресинаптической депрессии, скорее всего, лежит инактивация кальциевых каналов, и вследствие этого снижается экзоцитоз [39]. С другой стороны, деполимеризация актина

тоже снижает входящий кальциевый ток [87, 115], так что различия в эффектах ингибиторов пока непонятны. Связывание с фаллоидином ограничивают некоторые ассоциированные с актином белки, в том числе кофиллин, и это определяет специфику его эффектов [47].

Увеличение эффективности синапсов после индукции LTP может быть причиной стабилизации синаптического F-актина и ассоциированных с ним протеинов [60]. Аппликация латрукулина А на переживающие срезы гиппокампа взрослых крыс ухудшает поддержание LTP, однако этот эффект зависит от момента аппликации [14]. Известно, что латрукулин А блокирует полимеризацию актина и его действие, как полагают [47], направлено преимущественно на короткие лабильные филаменты.

Согласно развиваемым здесь представлениям, прекращение роста и развития этих филаментов может нарушать процесс консолидации. Уже через 10 мин после тетанизации, LTP становится устойчивой к латрукулину А и, следовательно, процесс консолидации заканчивается в течение этого короткого периода [14]. При использовании в качестве объекта исследования более простых нервных систем тоже было обнаружено, что синапсы, реагирующие на высокочастотное раздражение увеличением секреции, демонстрируют дефицит потенциации после обработки латрукулином А [116, 117]. В культуре нейронов гиппокампа латрукулин А предотвращает потенциацию и увеличение RRP после активации пресинаптических кальциевых каналов, а также рост числа активных бутонов [50].

Простая аппликация латрукулина А в стационарных условиях не влияет на рециркуляцию везикул, эндоцитоз и экзоцитоз [39, 46, 47]. Вместе с тем, в одних экспериментах латрукулин А приводит к увеличению секреции медиатора, которое сопровождается снижением PPF, что свидетельствует об увеличении выброса медиатора [47]. В других экспериментах спонтанная и вызванная синаптическая активность снижается [48, 87]. Такое же разнообразие эффектов наблюдается и при сочетании латрукулина А с низкочастотной стимуляцией [39, 46, 118]. Судя по всему, преобладание деполимеризации само по себе не определяет характер модификаций [4, 46, 47], и окончательный эффект зависят, по всей вероятности, от условий стимуляции, “молекулярного фона” и других особенностей функционального состояния синапса. В том числе нельзя исключить и роль системных факторов.

Необходимо отметить, что такое состояние фактически воспроизводит, по крайней мере, частично, то, что предположительно происходит на самых ранних стадиях консолидации и связано с дестабилизацией синапсов. Поэтому более тща-

тельное и продуманное исследование с использованием этого ингибитора может способствовать дальнейшему развитию наших представлений о ранней фазе консолидации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре данные неопровержимо свидетельствуют о ключевой роли актина в регуляции пресинаптических функций и дают основание продолжить исследования зависимых от актина механизмов долговременной синаптической пластичности. В рамках представлений о дестабилизации и стабилизации синапсов в фазе консолидации одним из существенных для запоминания факторов является реорганизация актинового матрикса. Закономерности реполимеризации актина при долговременной пластичности — предмет малоизученный. Наименее доступной для исследования является самая ранняя фаза консолидации, связанная с деполимеризацией актина и дестабилизацией синапсов. Имеются основания полагать, что состояние актиновых филаментов само по себе не определяет характер модификаций и от их реполимеризации зависит в основном консолидация и поддержание индуцируемых другими сигналами модификаций. Вместе с тем, зависимость эффективности синапсов и их динамических характеристик от состояния актинового матрикса создает условия для поддержания их индивидуального разнообразия в соответствии с принадлежностью к нейросетевым механизмам реализации приспособительного поведения [119].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 гг. (AAAA-A17-117092040002-6). Дополнительное внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meyer D., Bonhoeffer T., Scheuss V. // *Neuron*. 2014. V. 82. P. 430–443.
2. Кудряшова И.В. // *Нейрохимия*. 2019. Т. 36. № 1. С. 3–13.
3. Choquet D., Triller A. // *Neuron*. V. 80. № 3. 2013. P. 691–703.
4. Cingolani L.A., Goda Y. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. V. 9. P. 344–356.
5. Ramachandran B., Frey J.U. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. P. 12167–12173.
6. Krucker T., Siggins G.R., Halpain S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 6856–6861.
7. Fukazawa Y., Saitoh Y., Ozawa F., Ohta Y., Mizuno K., Inokuchi K. // *Neuron*. 2003. V. 38. P. 447–460.
8. Kramar E.A., Lin B., Rex C.S., Gall C.M., Lynch G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 5579–5584.
9. Chen L.Y., Rex C.S., Casale M.S., Gall C.M., Lynch G. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 5363–5372.
10. Messaoudi E., Kanhema T., Soule J., Tiron A., Dageyte G., da Silva B., Bramham C.R. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 10445–10455.
11. Fischer A., Sananbenesi F., Schrick C., Spiess J., Radulovic J. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. P. 1962–1966.
12. Tamano H., Minamino T., Fujii H., Takada S., Nakamura M., Ando M., Takeda A. // *Hippocampus*. 2015. V. 25. № 8. P. 952–962.
13. Yang Y., Wang X.B., Frerking M., Zhou Q. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 5740–5751.
14. Rex C.S., Chen L.Y., Sharma A., Liu J., Babayan A.H., Gall C.M., Lynch G. // *J. Cell Biol.* 2009. V. 186. № 1. P. 85–97.
15. Galvez B., Gross N., Sumikawa K. // *Neuropharmacology*. 2016. V. 105. P. 378–387.
16. Rex C.S., Gavin C.F., Rubio M.D., Kramar E.A., Chen L.Y., Jia Y., Haganir R.L., Muzyczka N., Gall C.M., Miller C.A., Lynch G., Rumbaugh G. // *Neuron*. 2010. V. 67. № 4. P. 603–617.
17. Lynch G., Rex C.S., Gall C.M. // *Neuropharmacology*. 2007. V. 52. P. 12–23.
18. Kelly M.T., Yao Y., Sondhi R., Sacktor T.C. // *Neuropharmacology*. 2007. V. 52. P. 41–45.
19. Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G.C., Kasai H. // *Nature*. 2004. V. 429. P. 761–766.
20. Lang C., Barco A., Zablow L., Kandel E.R., Siegelbaum S.A., Zakharenko S.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 16665–16670.
21. Bellot A., Guivernau B., Tajés M., Bosch-Morató M., Valls-Comamala V., Muñoz F.J. // *Brain Research*. 2014. V. 1573. P. 1–16.
22. Bosch M., Castro J., Saneyoshi T., Matsuno H., Sur M., Hayashi Y. // *Neuron*. 2014. V. 82. P. 444–459.
23. Zakharenko S.S., Zablow L., Siegelbaum S.A. // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. P. 711–717.
24. Antonova I., Arancio O., Trillat A.C., Wang H.G., Zablow L., Udo H., Kandel E.R., Hawkins R.D. // *Science*. 2001. V. 294. P. 1547–1550.
25. Monday H.R., Younts T.J., Castillo P.E. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2018. V. 41. P. 299–322.
26. Sanderson T.M., Georgiou J., Collingridge G.L. // *Front. Neural Circuits*. 2020. 14: 9.
27. Blundon J.A., Zakharenko S.S. // *Neuroscientist*. 2008. V. 14. № 6. P. 598–608.
28. Enoki R., Hu Y.-L., Hamilton D., Fine A. // *Neuron*. 2009. V. 62. P. 242–253.
29. Kandel E.R., Dudai Y., Mayford M.R. // *Cell*. 2014. V. 157. P. 163–186.
30. Malinow R., Tsien R.W. // *Nature*. 1990. V. 46. P. 177–180.

31. *Malgaroli A., Ting A.E., Wendland B., Bergamaschi A., Villa A., Tsien R.W., Scheller R.H.* // *Science*. 1995. V. 268. P. 1624–1628.
32. *Nicoll R.A., Malenka R.C.* // *Nature*. 1995. 377. P. 115–118.
33. *Emptage N.J., Reid C.A., Fine A., Bliss T.V.* // *Neuron*. 2003. V. 38. P. 797–804.
34. *Sokolov M.V., Rossokhin A.V., Astrelin A.V., Frey J.U., Voronin L.L.* // *Brain Res*. 2002. V. 957. P. 61–75.
35. *Bayazitov I.T., Richardson R.J., Fricke R.G., Zakharenko S.S.* // *J. Neurosci*. 2007. V. 27. № 43. P. 11510–11521.
36. *Кудряшова И.В., Онуфриев М.В., Гуляева Н.В.* // *Нейрохимия*. 2014. Т. 31. № 3. С. 200–206.
37. *Bloom O., Evergren E., Tomilin N., Kjaerulff O., Low P., Brodin L., Pieribone V.A., Greengard P., Shupliakov O.* // *J. Cell Biol*. 2003. V. 161. P. 737–747.
38. *Shupliakov O., Bloom O., Gustafsson J.S., Kjaerulff O., Low P., Tomilin N., Pieribone V.A., Greengard P., Brodin L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 14476–14481.
39. *Bleckert A., Photowala H., Alford S.* // *J. Neurophysiol*. 2012. V. 107. № 12. P. 3479–3492.
40. *Davis G.W., Müller M.* // *Annu. Rev. Physiol*. 2015. V. 77. P. 251–270.
41. *Böhme M.A., McCarthy A.W., Grasskamp A.T., Beuschel C.B., Goel P., Jusyte M., Laber D., Huang Sh., Rey U., Petzoldt A.G., Lehmann M., Göttfert F., Haghighi P., Hell S.W., Oswald D., Dickman D., Sigrist S.J., Walter A.M.* // *Nat. Commun*. 2019. V. 10. P. 1085.
42. *Ackermann F., Waites C.L., Garner C.C.* // *EMBO Rep*. 2015. V. 16. P. 923–938.
43. *Walter A.M., Bohme M.A., Sigrist S.J.* // *Neurosci. Res*. 2018. V. 127. P. 3–13.
44. *Fifkova E., Delay R.J.* // *J. Cell Biol*. 1982. V. 95. P. 345–350.
45. *Hirokawa N., Sobue K., Kanda K., Harada A., Yorifuji H.* // *J. Cell Biol*. 1989. V. 108. P. 111–126.
46. *Sankaranarayanan S., Atluri P.P., Ryan T.A.* // *Nat. Neurosci*. 2003. V. 6. P. 127–135.
47. *Morales M., Colicos M.A., Goda Y.* // *Neuron*. 2000. V. 27. P. 539–550.
48. *Yao J., Qi J., Chen G.* // *J. Neurosci*. 2006. V. 26. № 31. P. 8137–8147.
49. *Rust M.B., Maritzen T.* // *Exp. Cell Res*. 2015. V. 335. P. 165–171.
50. *Guzman G.A., Guzman R.E., Jordan N., Hidalgo P.* // *Front. Cell Neurosci*. 2019. 13:125.
51. *Hallermann S., Silver R.A.* // *Trend. Neurosci*. 2013. V. 36. P. 185–194.
52. *Lee J.S., Ho W.K., Lee S.H.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. E765–E774.
53. *Lee J.S., Ho W.K., Neher E., Lee S.H.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 15079–15084.
54. *Miki T., Malagon G., Pulido C., Llano I., Neher E., Marty A.* // *Neuron*. 2016. V. 91. P. 808–823.
55. *Halpain S.* // *Nat. Neurosci*. 2003. V. 6. P. 101–102.
56. *Dillon C., Goda Y.* // *Annu. Rev. Neurosci*. 2005. V. 28. P. 25–55.
57. *Watanabe S., Rost B.R., Camacho-Perez M., Davis M.W., Sohl-Kielczynski B., Rosenmund C., Jorgensen E.M.* // *Nature*. 2013. V. 504. P. 242–247.
58. *Dason J.S., Smith A.J., Marin L., Charlton M.P.* // *J. Physiol*. 2014. V. 592. № 4. P. 621–633.
59. *Wu X.S., Lee S.H., Sheng J., Zhang Z., Zhao W.D., Wang D., Jin Y., Charnay P., Ervasti J.M., Wu L.-G.* // *Neuron*. 2016. V. 92. P. 1020–1035.
60. *Zhang W., Benson D.L.* // *J. Neurosci*. 2001. V. 21. № 14. P. 5169–5181.
61. *Chamberland S., Tóth K.* // *J. Physiol*. 2016. V. 594. № 4. P. 825–835.
62. *Körber Ch., Kuner Th.* // *Front. Synapt. Neurosci*. 2016. 8:5.
63. *Kaesler P.S., Regehr W.G.* // *Curr. Opin. Neurobiol*. 2017. V. 43. P. 63–70.
64. *Ghelani T., Sigrist S.J.* // *Front. Neuroanat*. 2018. 12:81.
65. *Dobrunz L.E., Stevens C.F.* // *Neuron*. 1997. V. 18. P. 995–1008.
66. *Moulder K.L., Mennerick S.* // *J. Neurosci*. 2005. V. 25. № 15. P. 3842–3850.
67. *Vicente-Manzanares M., Ma X., Adelstein R.S., Horwitz A.R.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2009. V. 10. P. 778–790.
68. *Augustine G.J.* // *Curr. Opin. Neurobiol*. 2001. V. 11. P. 320–326.
69. *Wadel K., Neher E., Sakaba T.* // *Neuron*. 2007. V. 53. P. 563–575.
70. *Thanawala M.S., Regehr W.G.* // *J. Neurosci*. 2013. V. 33. № 11. P. 4625–4633.
71. *Stölting G., Campos de Oliveira R., Guzman R.E., Miranda-Laferte E., Conrad R., Jordan N., Schmidt S., Hendriks J., Gensch Th., Hidalgo P.* // *J. Biol. Chem*. 2015. V. 290. № 8. P. 4561–4572.
72. *Evans L.L., Lee A.J., Bridgman P.C., Mooseker M.S.* // *J. Cell Sci*. 1998. V. 111. P. 2055–2066.
73. *Bahler M., Greengard P.* // *Nature*. 1987. V. 326. P. 704–707.
74. *Benfenati F., Valtorta F., Chiergatti E., Greengard P.* // *Neuron*. 1992. V. 8. P. 377–386.
75. *Benfenati F., Valtorta F., Rubenstein J.L., Gorelick F.S., Greengard P., Czernik A.J.* // *Nature*. 1992. V. 359. P. 417–420.
76. *Wang Z.-W.* // *Mol. Neurobiol*. 2008. V. 38. № 2. P. 153–166.
77. *Greengard P., Valtorta F., Czernik A.J., Benfenati F.* // *Science*. 1993. V. 259. P. 780–785.
78. *Jovanovic J.N., Sihra T.S., Nairn A.C., Hemmings H.C. Jr., Greengard P., Czernik A.J.* // *J. Neurosci*. 2001. V. 21. № 20. P. 7944–7953.
79. *Pieribone V.A., Shupliakov O., Brodin L., Hilfiker-Rothenfluh S., Czernik A.J., Greengard P.* // *Nature*. 1995. V. 375. P. 493–497.
80. *Vasileva M., Horstmann H., Geumann C., Gitler D., Kuner T.* // *Eur. J. Neurosci*. 2012. V. 36. P. 3005–3020.
81. *Mukherjee K., Yang X., Gerber S.H., Kwon H.B., Ho A., Castillo P.E., Liu X., Südhof Th.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 6504–6509.

82. Hanse E., Gustafsson B. // *J. Physiol. (Lond)*. 2001. V. 5371. P. 141–149.
83. Jackman S.L., Regehr W.G. // *Neuron*. 2017. V. 94. P. 447–464.
84. Dobrunz L.E. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2002. V. 20. P. 225–236.
85. Millar A.G., Bradacs H., Charlton M.P., Atwood H.L. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 22. P. 9661–9667.
86. Furukawa K., Smith-Swintosky V.L., Mattson M.P. // *Exp. Neurol.* 1995. V. 133. P. 153–163.
87. Kim C.H., Lisman J.E. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 4314–4324.
88. Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. // *Neuron*. 2001. V. 29. № 1. P. 197–208.
89. Carter A.G., Vogt K.E., Foster K.A., Regehr W.G. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 1. P. 21–28.
90. Cooper R.L., Winslow J.L., Govind C.K., Atwood H.L. // *J. Neurophysiol.* 1996. V. 75. P. 2451–2466.
91. Voglmaier S.M., Edwards R.H. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007. V. 17. P. 374–380.
92. Fioravante D., Regehr W.G. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. V. 21. P. 269–274.
93. Scullin C.S., Tafaya L.C., Wilson M.C., Partridge L.D. // *Brain Res.* 2012. V. 1431. P. 1–12.
94. Catterall W.A., Leal K., Nanou E. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 10742–10749.
95. Mochida S., Few A.P., Scheuer T., Catterall W.A. // *Neuron*. 2008. V. 57. № 2. P. 210–216.
96. Yan J., Leal K., Magupalli V.G., Nanou E., Martinez G.Q., Scheuer T., Catterall W.A. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2014. V. 63. P. 124–131.
97. Xie M., Li X., Han J., Vogt D.L., Wittemann S., Mark M.D., Herlitze S. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 178. P. 489–502.
98. Lou X. // *Front. Cell Neurosci.* 2018. 12:66.
99. Versteegen A.M., Tagliatti E., Lignani G., Marte A., Stolerio T., Atias M., Corradi A., Valtorta F., Gitler D., Onofri F., Fassio A., Benfenati F. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. P. 7266–7280.
100. Bernstein B.W., DeWit M., Bamberg J.R. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998. V. 53. P. 236–251.
101. Valtorta F., Greengard P., Fesce R., Chieriegatti E., Benfenati F. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 11281–11288.
102. Michel K., Müller J.A., Oprisoreanu A.M., Schoch S. // *Exp. Cell Res.* 2015. V. 335. P. 157–164.
103. Witke W., Podtelejnikov A.V., Di Nardo A., Sutherland J.D., Gurniak C.B., Dotti C., Mann M. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 967–976.
104. McGough A., Pope B., Chiu W., Weeds A. // *J. Cell Biol.* 1997. V. 138. P. 771–781.
105. Medeiros N.A., Burnette D.T., Forscher P. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 215–226.
106. Rosenmund C., Westbrook G.L. // *Neuron*. 1993. V. 10. P. 805–814.
107. Niwa R., Nagata-Ohashi K., Takeichi M., Mizuno K., Uemura T. // *Cell*. 2002. V. 108. P. 233–246.
108. Waites C.L., Leal-Ortiz S.A., Andlauer T.F., Sigrist S.J., Garner C.C. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. P. 14250–14263.
109. Bubb M.R., Spector I., Beyer B.B., Fosen K.M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 5163–5170.
110. Peng Y., Zhao J., Gu Q.-H.H., Chen R.-Q.Q., Xu Z., Yan J.-Z., Wang S.-H., Liu S.-Y., Chen Z., Lu W. // *Hippocampus*. 2010. V. 20. P. 646–658.
111. Holzinger A. // *Meth. Mol. Biol.* 2009. V. 586. P. 71–87.
112. Müller M., Genç Ö., Davis G.W. // *Neuron*. 2015. V. 85. P. 1056–1069.
113. Ortega J.M., Genç Ö., Davis G.W. // *eLife*. 2018. V. 7. P. e40385.
114. Photowala H., Freed R., Alford S. // *J. Physiol.* 2005. V. 569. P. 119–135.
115. Johnson B.D., Byerly L. // *Neuron*. 1993. V. 10. P. 797–804.
116. Cole J.C., Villa B.R., Wilkinson R.S. // *J. Physiol.* 2000. V. 525. P. 579–586.
117. Richards D.A., Rizzoli S.O., Betz W.J. // *J. Physiol. (Lond)*. 2004. V. 557. P. 77–91.
118. Sakaba T., Neher E. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 837–846.
119. Yasui T., Fujisawa Sh., Tsukamoto M., Matsuki N., Ikegaya Y. // *J. Physiol.* 2005. V. 566. № 1. P. 143–160.

Actin Rearrangement as a Factor of Presynaptic Plasticity

I. V. Kudryashova

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

The review presents recent findings on the mechanisms for the actin involvement into the regulation of pre-synaptic functions. In addition to the structural role of actin cytoskeleton in synaptic maintenance and stabilization, its functions are related to transport and anchoring of regulatory and signaling proteins; actin cytoskeleton can act as barrier for lateral diffusion promoting the formation of functionally active protein complexes. Research data indicate the involvement of presynaptic actin in release machinery. In particular it participates in recirculation of vesicles, this associated with actin repolymerization depending on the pattern of synaptic activity. It is supposed that actin depolymerization may initiate the reorganization of presynaptic actin cytomatrix, and stabilization of new frame after actin polymerization may support long-term maintenance of presynaptic as well as postsynaptic modifications.

Keywords: presynaptic plasticity, consolidation, destabilization, actin repolymerization, stabilization

УДК 612.821

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЛАСТИЧЕСКИХ ПЕРЕСТРОЕК, ВЫЗВАННЫХ ОБОГАЩЕНИЕМ СРЕДЫ. ВЛИЯНИЕ НА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ

© 2021 г. Г. А. Григорьян*

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.

После доработки 28.03.2021 г.

Принята к публикации 29.03.2021 г.

В настоящей обзорной работе приводятся данные о пластических перестройках в организме животных под влиянием обогащенной среды (ОС). ОС включает в себя три основных компонента: сенсорную стимуляцию, социальную стимуляцию и физическую активность. Каждый из этих компонентов имеет свои особенности и специфику влияния, но все они оказывают положительное влияние на организм. В первом разделе работы рассматриваются молекулярно-клеточные механизмы влияния ОС на нейрогенез, нейротрофические факторы и синаптогенез. Во втором разделе приводятся данные о влиянии ОС на пластические перестройки синаптической передачи в нейронах гиппокампа, на индукцию и поддержание длительной потенциации и длительной депрессии ответов нейронов 3Ф и поля CA1 гиппокампа, нейрохимические механизмы влияния ОС и опыт использования трансгенных животных. В третьем и четвертом разделах рассматривается влияние ОС на обучение и память у нормальных животных и у животных с нарушением когнитивных, эмоциональных и двигательных функций.

Ключевые слова: обогащенная среда, гиппокамп, нейрогенез, BDNF, синаптогенез, синаптическая передача, ДП, обучение, память

DOI: 10.31857/S1027813321030055

Впервые влияние обогащенной среды на поведение крыс заметил Д. Хебб [1]. Он обратил внимание на то, что крысы, перенесенные с раннего возраста из лаборатории в домашние условия, оказались более умными, чем те, которые содержались в лаборатории. Позднее, в 60-х годах прошлого века влияние обогащенной среды на поведение крыс более детально исследовали Марк Розенцвейг с коллегами [2–5]. М. Розенцвейг дал определение обогащенной среде, как комбинации “неодушевленной и социальной стимуляции”. С тех пор принципиально мало что изменилось в определении и понимании термина “обогащенная среда” (ОС) как с теоретической, так и с практической (процедурной) точки зрения. Обогащенная среда представляется как содержание крыс или мышей в больших группах (социальная стимуляция) или в больших клетках, в которые помещаются разные игрушки и предметы, материал для строительства гнезд, трубки, в которых можно прятаться (сенсорная стимуляция), лесенки и колеса для бега (физическая активность), по сравнению с животными, содержащи-

мися в стандартных условиях. В ряде случаев используются одинаковые размеры клеток, но варьирует число животных в клетках; в других случаях в клетки добавляют игрушки и другие предметы для ОС при одинаковом числе животных. Кроме того, ОС используется как для постоянного, так и временного проживания в ней, иногда с перерывами, по несколько размещений в ОС за определенный период времени. Другими словами, в отличие от других парадигм, ОС не является хорошо стандартизированной процедурой. Тем не менее, эффекты ее относительно устойчивые и повторяемые. По мнению Дж. Кемперманна [6], “парадигма “обогащение среды” является одной из наиболее успешных концепций в экспериментальной биологии и психологии, поскольку позволяет исследовать фундаментальную пластическую связь между структурой и функцией”.

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ

Обогащение среды вносит существенные изменения в молекулярно-клеточные и биохимические процессы организма, обеспечивая новые

* Адресат для корреспонденции: 117865 Россия, Москва, ул. Бутлерова, д. 5а; тел.: 495-344-70-00; e-mail: grigorygrigoryan@hotmail.com.

функциональные состояния и соответствующие им пластические перестройки во многих структурах мозга. Эти перестройки поддерживают активное состояние организма и его позитивно-направленную деятельность.

Нейрогенез. Влияние обогащенной среды на нейрогенез гиппокампа детально изложено в обзорах Г. Клеменсона и соавт. [7, 8]. Как уже упоминалось, существуют различные варианты обогащения окружающей среды, такие как изменение размеров пространства, в котором происходит ОС, использование игрушек и других неодушевленных предметов, туннелей, колеса для бега, времени, используемого для ОС, возраста, с которого она начинается и т.д. В зависимости от использования этих вариантов не всегда получаются однозначные результаты, иногда они противоречат друг другу, а иногда эффекты ОС вообще никак не проявляются. Однако существуют факторы ОС, которые оказывают безусловное влияние на нейропластичность гиппокампа и поведение. Важнейшим из этих факторов является физическая активность, которая чаще всего достигается с помощью колеса для бега, помещенного в ОС [9, 10]. В работе [9] использование бромдеоксиуридина (BrdU) в качестве маркера делящихся клеток показало отчетливую пролиферацию гранулярных клеток зубчатой фации (ЗФ) гиппокампа при помещении колеса для бега в клетку. Через 4 нед. после инъекции BrdU было обнаружено большое число BrdU положительных клеток у группы животных, находившихся в ОС с разнообразием неодушевленных предметов (сенсорная стимуляция), и у группы ОС за счет физической активности (“бегуны”). Физическая активность не только увеличивала пролиферацию новорожденных клеток, но и улучшала их выживаемость. Интересно, что изменения в числе BrdU положительных клеток вызывались на следующий день после последней инъекции BrdU только у группы “бегунов”, которые почти в два раза превышали (усиление пролиферации) значения новорожденных клеток у других групп. Через 4 нед. достоверное увеличение BrdU положительных клеток наблюдалось как у группы “бегунов”, так и у группы, содержащейся в богатой предметами ОС (улучшение выживаемости). У двух других групп, одну из которых обучали в лабиринте Морриса находить скрытую под водой платформу, а другой давали возможность просто поплавать, уровень пролиферации новых клеток и степень их выживаемости не отличались от значений контрольных мышей. Бег в колесе вызывал усиление длительной потенциации (ДП) нейронов ЗФ, а новорожденные клетки хорошо интегрировались в существующую нервную сеть гиппокампа [11, 12]. В частности, Г. ван Праг и соавт. [11] с помощью ретровирусного вектора экспрессии зеленого флюоресцентного протеина, который проникает в делящиеся клетки, показали на переживающих

срезах гиппокампа, что новорожденные клетки являются полноценными нейронами, встраивающимися в структуру гранулярного слоя ЗФ. У мышей “бегунов” улучшалось обучение в водном лабиринте Морриса, усиливалась ДП ответов нейронов ЗФ гиппокампа в опытах на срезах, и увеличивалось количество BrdU положительных клеток [12]. Усиление нейрогенеза под влиянием ОС с помощью сенсорной стимуляции (разнообразия предметов в обстановке) и при помощи физической активности улучшало обучение и память в водном лабиринте Морриса [10]. Некоторые авторы полагают, что физическая активность, как фактор ОС, является главным элементом нейрогенного и нейротрофического влияния ОС [13, 14]. В работе [13] молодые самки мышей линии C57Bl/6 содержались в стандартных контрольных условиях, в ОС с выполнением физических упражнений (бег в колесе), и в комбинации ОС с обилием предметов (сенсорная стимуляция) и физическими упражнениями. Нейрогенез гиппокампа тестировали через 12 дней, а дифференциацию клеток через 1 мес. Пролиферация новых клеток, их выживаемость, число новорожденных нейронов и уровень нейротрофинов увеличивались только у группы “бегунов” [13]. Похожие данные были получены в работе [14], тоже на мышах той же линии C57BL/6J, но только у самцов. Мыши содержались в течение 32 дней в группах: 1) “бегунов”, 2) в ОС с сенсорной стимуляцией, 3) бегунов + ОС с сенсорной стимуляцией, 4) в стандартных условиях. Группа бегунов проходила такое же расстояние, как и группа бегунов + ОС, но добавление предметов в клетку “бегунов” не усиливало гиппокампальный нейрогенез [14]. Примечательно, что только группа “бегунов” лучше обучалась в водном лабиринте Морриса по сравнению с группой, содержащейся в стандартных условиях. Но ОС могла влиять на пластические перестройки и без физической активности [15–17]. Крысы, содержащиеся в ОС в течение 3-х и 6-и недель, проявляли лучшую память узнавания нового предмета по сравнению с контрольными животными, а содержащиеся в ОС в течение 6-и недель лучшую пространственную и рабочую память [16]. У крыс, содержащихся в ОС, была обнаружена высокая концентрация нервного фактора роста (NGF) и большое число выживших предшественников субгранулярных клеток (меченных BrdU) в ЗФ гиппокампа. Некоторые авторы считают, что физические упражнения преимущественно влияют на пролиферацию новых клеток, а ОС (без физических упражнений) на выживаемость нейронов [9]. Причем, эффекты обоих факторов ОС могут суммироваться, в результате гиппокампальный нейрогенез проявляется сильнее, чем при действии только одного из них [18]. Г. Клеменсоном и соавт. [8, 15] был проведен интересный опыт (“pattern separation”), суть которого заключается в

том, что животному предоставлялась возможность дифференцировать два идентичных контекста, но с разной функциональной нагрузкой. В контексте № 1 животные получали электрошок, а в другом, точно таком же контексте № 2, шок они не получали. Оказалось, что дифференцировку контекстов успешно осуществляли те мыши, которые, содержались в ОС без колеса для бега, т.е. без физических упражнений. Мыши, содержащиеся в ОС с колесом для бега, проявляли высокую степень физической активности, но с дифференцировкой справиться не могли, несмотря на то, что нейрогенез у них был выражен сильнее, чем у группы мышей, которые справлялись с дифференцировкой [8, 15]. Важным условием для влияния ОС является исследование пространства во время пребывания в ОС [17, 19]. При обследовании пространства, помимо исследовательской активности у животных развивается общая физическая активность и двигательные реакции. В работах [17, 19] мышам вводили радиочастотные идентификационные транспонеры и по внешним антеннам, расположенным вокруг исследуемого пространства, оценивали исследовательское поведение животных в течение 4-х мес. Было обнаружено, что мыши с высокой исследовательской пространственной энтропией имели более интенсивный нейрогенез в гиппокампе, чем мыши с низкой энтропией, хотя корреляции между нейрогенезом и общей пройденной дистанцией не наблюдалось [17]. В работе [20] было показано, что нейрогенез вызывается при помещении мышей в ОС продолжительностью 40 дней. У животных этой группы значительно увеличивалось число гранулярных клеток гиппокампа и улучшалось обучение в лабиринте Морриса по сравнению с мышами, содержащимися в стандартных условиях. Но даже короткое (24 часа) пребывание в ОС без колеса или с колесом для бега вызывало разную пролиферацию гранулярных клеток 3Ф гиппокампа [21]. Сразу после помещения животных в ОС и на начальном этапе бега разницы в числе BrdU положительных клеток у двух групп не было. Но уже спустя 24 ч у обеих групп наблюдалось значительное увеличение BrdU+ клеток и BrdU+/Nestin-GFP+/Prox1+ (тип 2б) клеток по сравнению с контрольными животными. Причем у группы с физическими упражнениями специфически возрастало число BrdU+/Nestin-GFP+/Prox1– (тип 2а) клеток, а у группы ОС без физических упражнений специфически увеличивалось число BrdU+/Nestin-GFP+/Prox1+ (тип 3) клеток. Эти данные свидетельствуют о дифференцированном влиянии ОС с физическими упражнениями и без них на нейрогенез гиппокампа [8, 15]. У животных, которые проводили разное время в ОС, наблюдались изменения в пролиферации, дифференциации и выживании вновь рожденных нейронов в гиппокампе [9]. Выраженность нейрогенеза зависела от

продолжительности влияния ОС. Например, у животных, которые полжизни (10 месяцев) проводили в условиях ОС, нейрогенез был в 5 раз выше, чем у контрольных животных [22]. Но и 7-и дневное пребывание в условиях ОС также оказывало влияние на нейрогенез. Время пребывания в ОС влияло на выживаемость новых нейронов и на их функциональные характеристики [23]. В работе Р. Спейсман и соавт. [24] была установлена связь между обучением в водном лабиринте Морриса и уровнем нейрогенеза у старых крыс самцов линии Фишер 344, содержащихся в условиях ОС в течение 10 нед. У старых крыс (22 мес.) под влиянием ОС происходило улучшение нейрогенеза, судя по количеству BrdU положительных клеток в гиппокампе, и одновременно улучшалось пространственное обучение в водном лабиринте Морриса по сравнению с контрольной группой. Известно, что ключевая роль в нейрональных реакциях на действие ОС принадлежит высвобождению BDNF (нейротрофический фактор мозга) и MAPK (митоген активируемая протеин киназа). Оба эти фактора ведут к стимуляции нейрогенеза. Митоген- и стресс-активируемая протеин киназа 1 (MSK1) является ядерным ферментом, участвующим в сигнальных путях BDNF и MAPK. На нокаутных MSK1 мышах было установлено, что этот фермент участвует в регуляции нейрогенеза. Но в работе [25] на мышах с нокаутом протеина MSK1 не было выявлено разницы в пролиферации нейронов субгранулярной зоны под влиянием мутации MSK1 kinase-dead (KD) по сравнению с контрольными значениями после 5 нед. пребывания в ОС. В то же время при сравнении с дикими мышами число DCX (doublecortin) позитивных клеток было больше у стандартно проживавших мышей и мышей группы MSK1 KD, содержащихся в условиях ОС. Это свидетельствует о том, что хотя фермент MSK1 не влияет на базовый уровень пролиферации нейрональных предшественников, он участвует в отрицательной регуляции числа потенциальных клеток-кандидатов в нейроны, контролируя количество новых нейронов, интегрируемых в структуру 3Ф [25]. Вообще, роль фермента MSK1, участвующего в сигнальных путях BDNF и MAPK, особенно значима в процессах пространственного обучения и влияниях на ДП и длительную депрессию (ДД). Предполагается, что фермент MSK1 служит в качестве переключателя от старого обучения путем развития ДД в нервной сети, соответствующей этому обучению, к новому опыту, посредством развития ДП в нервной сети, соответствующей этому новому опыту [26]. Он регулирует большое число генов, вовлекаемых в процесс обогащения среды. Формирование нового опыта связано со снижением влияния этого фермента (downregulation) на регуляцию ключевой митоген-активируемой протеин киназы (MAPK) и генов, связанных с пластичностью EGR1/Zif268

и Arc/Arg3.1. В результате устанавливается новый геномный ландшафт, адаптированный к новому опыту. Связывая накопленный опыт с гомеостатическими изменениями в экспрессии генов, MSK1 представляет собою первичный механизм, через который внешняя среда регулирует экспрессию генов, синаптические перестройки и процесс обучения [26]. Недавно было показано, что ОС влияет на нейрогенез через усиление активности рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), увеличивая число новых клеток у самцов и самок мышей [27]. Рецептор FGF активируется под влиянием ОС через активацию соответствующих нейротрансмиттеров. Субстрат (FRS) рецептора FGF индуцирует пролиферацию стволовых клеток, а с помощью FRS и фосфоорилазы Cγ увеличивается число новорожденных нейронов. В работе [28] было показано, что ОС в раннем онтогенезе (с 5–6-го постнатального дня) всего на несколько дней вызывает усиление пролиферации на 18-й день и рост выживаемости клеток на 45-й дни жизни, соответственно на 37 и 31% по сравнению с животными (морские свинки), содержавшимися в стандартных условиях.

Нейротрофические факторы (BDNF). ОС тесно взаимодействует с нейротрофическими факторами, многие из которых поддерживают развитие и сохранение нейронов мозга. Главный из них, BDNF — поддерживает жизнедеятельность и дифференциацию нейронов, рост невритов и образование синапсов [29, 30]. Не удивительно поэтому, что BDNF играет столь важную роль в обучении и памяти, и является одной из основных молекул, связанных с влияниями ОС [31, 32]. BDNF участвует в нейрогенезе гиппокампа, установлена его связь с пролиферацией, дифференциацией и выживанием вновь рожденных нейронов [33, 34]. В частности, в работе [33] была показана роль BDNF/TrkB сигналинга в нейрогенезе гиппокампа. При удалении рецептора TrkB через Cre экспрессию у мутантных мышей TrkB(lox/lox) через 4 нед. после дилатации замедлялся рост дендритов и шипиков у новорожденных нейронов. Позже, в стадию, когда у новорожденных нейронов облегчается синаптическая пластичность и они легко интегрируются в функциональные нервные сети, отсутствие TrkB вызывало ослабление зависимой от нейрогенеза длительной потенциации и ухудшение выживаемости новых клеток [33]. В похожей работе при выключении TrkB у мутантных мышей (trkB(lox/lox)CaMKII-CRE) в возрасте 15 недель наблюдалось уменьшение плотности шипиков и значительное увеличение длины шипиков апикальных и базальных дендритов в поле CA1 гиппокампа [35]. Введение BDNF в гиппокамп вызывало усиление нейрогенеза [34], а гиперэкспрессия BDNF у мышей усложняла конфигурацию дендритного дерева в 3Ф гиппокампа по сравнению с контрольными животными [36]. Дефицит BDNF

уменьшал экспрессию генов нейротрансмиттеров, особенно в раннем возрасте во фронтальной коре [37]. ОС усиливала экспрессию большего числа генов в раннем возрасте по сравнению с более поздними периодами жизни, и особенно у мышей с дефицитом BDNF. Так, у мышей с недостатком BDNF (activity-dependent BDNF-deficient, KIV mice) под влиянием ОС до 2-х месячного возраста усиливалась экспрессия генов транспортера серотонина, адренорецептора альфа 1D, глутаматного ионотропного рецептора AMPA (субъединица 3), GABA A рецептора, альфа 5 GABA B рецептора (субъединица 2), GABA транспортера, GABA A рецептора (субъединица гамма 3), глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа, холинергического никотинового рецептора (субъединица альфа 7) и нормализовалась их активность в последующей жизни [37]. В работе [38] у крыс, содержавшихся в ОС от 2-х до 48-и часов в течение 30 дней, происходило увеличение экспрессии BDNF, TrkB и DNA метилтрансферазы 3A в гиппокампе и в дорсальном стриатуме. Интересно, что экспрессия указанных генов была больше выражена при частичном варианте ОС, чем при постоянном пребывании мышей в условиях ОС [38]. Обогащение среды в подростковом периоде увеличивало экспрессию BDNF в префронтальной коре у самок [39]. У гетерозиготной нокаутной BDNF мыши при помещении в ОС не наблюдалось увеличения нейрогенеза гиппокампа в противоположность контрольным мышам [32]. Также происходило ослабление пролиферативных эффектов нейрогенеза, вызванного физическими упражнениями у мышей с отсутствием рецептора TrkB в гиппокампе у клеток предшественников [40]. Эти данные указывают на то, что BDNF и сигнальные пути BDNF–TrkB играют важную роль в нейропластичности, вызванной обогащенной средой. Предполагается, что усиление активности тканевого плазминогенного активатора (tPA) вызывает усиление BDNF сигналинга за счет конверсии незрелой формы BDNF в зрелую форму с помощью плазмина [41]. Под влиянием обогащенной среды происходит усиление экспрессии рецептора BDNF (TrkB), более легкое связывание BDNF со своим рецептором и запуск внутриклеточного сигнального каскада. Активируются сразу несколько путей: фосфорилирование протеинкиназы B (Akt) и уменьшение активности гликоген синтазы киназы бета (glycogen synthase kinase β, GSK3β), которая в свою очередь снижает интенсивность тау фосфорилирования. Этот путь блокируется у трансгенной APPswe/PS1ΔE9 мыши. В результате усиления BDNF и его связи с рецептором TrkB под влиянием ОС могут также активироваться MAPK пути (Ras/Raf/MEK/MAPK), и RSK2/MSK пути (40S ribosomal protein S6 kinase и mitogen- and stress-activated protein kinase). Кроме того, активируется NMDAR-индуцируемая Ca²⁺/

калмодулин-зависимая протеин киназа. Это ведет к усилению фосфорилирования CREB и регуляции экспрессии генов, необходимых для образования долгосрочной памяти, включая BDNF и IGF-2 (инсулиноподобный фактор роста-2) (см. гипотетическую схему влияния ОС на внутриклеточный сигналинг в работе [41]).

Другие нейротрофические факторы. Васкулярно-эндотелиальный фактор роста (VEGF) является сильным промотором васкулогенеза и ангиогенеза, оба тесно связаны с нейрогенезом гиппокампа [42]. Васкулиризация гиппокампа является важнейшим фактором для нейрогенеза гиппокампа [42]. Пребывание в ОС и особенно физическая активность усиливают васкулиризацию и экспрессию VEGF в гиппокампе [43, 44]. Ряд других трофических факторов также участвуют в усилении нейрогенеза под влиянием ОС, например, NGF – вовлекается в рост, дифференциацию и выживаемость холинэргических нейронов [45, 46]. Блокада NGF ведет к уменьшению ДП и ослаблению пространственной памяти [45]. Экспрессия NGF усиливается в условиях ОС, что свидетельствует о вовлечении этого фактора в нейропластичность гиппокампа [16, 47, 48]. В отличие от NGF, фактор роста фибробластов 2 (FGF-2) и инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) более специфично связаны с физической активностью, чем просто с ОС [49, 50], но роль IGF-1 проявляется отчетливее.

Синаптогенез. Обогащенная среда вызывает существенные микроструктурные преобразования синаптического аппарата. Она влияет на количество синаптических контактов, разветвленность дендритного дерева и плотность шипиков в гиппокампе и других структурах мозга. И. Грин и соавт. [51] первые обнаружили, что содержание взрослых крыс в ОС в течение 45 дней вызывает у них морфогистологические изменения в 4-ом стеллатном и 3-ем пирамидном слое корковых нейронов затылочной коры. В обоих слоях коры нейроны имели более длинные (небифуркационные) ответвления и большее число ветвей 2 и 5 порядков по сравнению с контрольной группой. ОС с помощью усиления социальных влияний (увеличение сообщества животных, проживающих вместе) и физической активности (бег в колесе) вызывала у крыс усиление ветвления дендритов и плотности шипиков в 3 пирамидном слое париетальной коры [52]. В другой работе [53] ОС посредством усиления социальных влияний увеличивала плотность шипиков в 3Ф гиппокампа, а с помощью физической активности – в поле СА1 гиппокампа. В ранних работах было показано, что ОС усложняет дендритное дерево гранулярных клеток 3Ф, но только в том случае, если она начинается с раннего возраста, и не влияет на него, если ОС начинается во взрослом периоде [54]. В работе [55] у самок крыс происходили более сильные изменения дендритного дерева под влиянием

ОС, чем у самцов. Это касалось длины дендритов и усложнения конфигурации дендритного дерева в слоях 3Ф. ОС усиливала плотность дендритных шипиков на клетках поля СА1 гиппокампа у крыс [56] и мышей, причем не только у нормальных, но и нокаутных с отсутствием субъединицы 1 NMDA рецепторов (CA1-KO) [57]. У крыс, бывших 6 нед. в ОС, увеличивалась экспрессия синаптофизина и синапсина 1 в 3Ф, что свидетельствует об участии ОС в усилении синаптогенеза [16]. Похожие данные были получены на мышцах-самцах линии C57BL/6, которые находились в ОС в течение 4 нед. [58]. У них было больше синапсов, подсчитанных с помощью электронного микроскопа, больше выражена экспрессия протеина 43, синаптофизина и плотность постсинаптического протеина 95 в гиппокампе. Пребывание в ОС в течение 9-и недель крыс, испытавших ишемический инсульт, сохраняло плотность дендритных шипиков гиппокампа на том же уровне, что у контрольных животных, хотя у группы с гипоксическим инсультом плотность дендритных шипиков в поле СА1 гиппокампа значительно уменьшалась [59]. У крыс с двусторонними повреждениями вентрального отдела субикулюма уменьшалось дендритное ветвление и плотность шипиков на пирамидных клетках гиппокампа [60]. Размещение крыс с повреждениями в ОС в течение 10 дней значительно усиливало дендритное ветвление и плотность шипиков нейронов. Под влиянием ОС происходило усиление пресинаптического протеина, синаптофизина в гиппокампе и фронто-париетальной коре и постсинаптического протеина, PSD 95 во многих структурах мозга у мышей линии C57BL/6 [61, 62].

ИЗМЕНЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГИППОКАМПА ПОД ВЛИЯНИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ

Синаптическая передача. Оценивая влияние ОС среды на синаптическую передачу в нейронах гиппокампа (по эффектам ДП и длительной депрессии ДД), необходимо учитывать временные соотношения между индукцией ДП/ДД и проявлением ОС. Важную роль при этом играют возраст животного, с которого начинается действие ОС, продолжительность действия ОС, звенья гиппокампа, с которых регистрируется синаптическая активность и ряд других факторов. Некоторые из них подробно освещены в обзорах У. Абрахама [63, 64] и в нашей работе [65]. Е. Грин и У. Гринау [66] в опытах на срезах первыми показали, что ОС усиливает фоновую синаптическую передачу в нейронах 3Ф гиппокампа крыс, если они пребывали в ОС не менее 4-х нед. Было обнаружено усиление возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) в гранулярных клетках 3Ф при стимуляции медиального перфо-

рантного пути, отражающих эффективность синаптической передачи; и популяционных спайков, отражающих число постсинаптических потенциалов действия. Крутизна нарастания ВПСП в молекулярном слое 3Ф была значительно больше в срезах гиппокампа крыс, содержащихся в ОС. Эти различия наблюдались, если исследование ВПСП и популяционного спайка начинали сразу после прекращения влияния ОС. Если крыс после этого еще в течение 3–4 нед. содержали индивидуально, а потом сравнивали с крысами, которых содержали индивидуально в течение 7–8 нед., то различий в величинах ВПСП и популяционного спайка на гиппокампальных срезах у крыс двух групп не выявлялось. Это говорит о том, что влияние ОС на синаптическую передачу в звене перфорантный путь–3Ф гиппокампа имеет временное преходящее значение. Другие авторы также наблюдали усиление синаптической передачи в клетках 3Ф и звене СА3–СА1 [67, 68]. Например, в работе [67] в опытах на срезах было показано усиление синаптической передачи (увеличение амплитуды ВПСП) в клетках поля СА1 гиппокампа под влиянием ОС. Обогащение среды влияло на среднюю унитарную синаптическую активность внутриклеточно регистрируемых пирамидных клеток поля СА1, размеры квантов, тренд входного сопротивления и порога (уменьшение) вызова унитарного ответа. Было высказано предположение, что усиление синаптической передачи под влиянием ОС происходит за счет увеличения числа и эффективности рецепторов на синапсах и возникновения новых функциональных синаптических контактов между ранее несвязанными клетками поля СА3 и СА1 [67]. В другой работе [68] на срезах была показана роль NMDA рецепторов во влиянии ОС на синаптическую передачу в звене перфорантный путь–3Ф. У крыс, содержащихся в ОС, *in vitro* на срезах гиппокампа усиливалась сила синаптической связи, а амплитуда ДП уменьшалась. Введение антагониста NMDA рецепторов, AP5 подавляло синаптические функции. ОС облегчала ДП в звене коллатерали Шаффера–пирамидные нейроны поля СА1 [56]. Но при этом происходило увеличение частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов, а не амплитуды ответов. Нейроны поля СА1 разряжались с большей частотой в ответ на соматическую деполяризацию и в процессе индукции ДП. ОС уменьшала пороги спайковой активности и амплитуду постгиперполяризации. Авторы считают, что ОС может усиливать пластические свойства нейронов поля СА1 не только за счет усиления синаптической активности и роста числа синаптических контактов, но и благодаря способности пирамидных клеток вызывать разрядную активность, объединяя оба эти свойства в инструмент усиления ДП [56]. Имеются работы, в которых усиление синаптических эффектов как в

звене перфорантный путь–3Ф, так и в звене коллатерали Шаффера–пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа под влиянием ОС не было обнаружено [69, 70]. В частности, Г. Жу и соавт. [69] показали, что ОС улучшает мозговое кровообращение после двухсторонней окклюзии 2-х сонных артерий и частично восстанавливает ДП гиппокампа, но не влияет на базовую синаптическую передачу и количество высвобождаемых пресинаптических медиаторов. Эти данные практически повторили М. Баят и соавт. [71], которые после двухсторонней окклюзии сонных артерий у крыс наблюдали улучшение обучения и памяти в многоканальном радиальном и водном лабиринтах после пребывания животных в ОС. Однако ОС не влияла на фоновую синаптическую передачу и пресинаптическую активность у крыс, испытывавших гипоксию, хотя частично восстанавливала индукцию ДП [71]. 3-х месячное содержание мышей в ОС улучшало обучение и память у молодых, но не у старых мышей, однако влияния на базовую синаптическую передачу при этом не наблюдалось [70]. М. Экерт и У. Абрахам [72] помещали крыс в ОС на 3 мес., сразу после этого крыс забивали (*ex vivo* исследования), готовили срезы мозга и исследовали изменения синаптической передачи. К удивлению авторов, они не обнаружили каких-либо изменений в синаптической передаче как в звене перфорантный путь–3Ф, так и в звене СА3–СА1. Стимуляция перфорантного пути *in vivo* также не выявила разницы между животными, содержащимися в ОС и контрольной группой [73]. Авторы объясняют полученные данные разными условиями обогащения среды и разной его продолжительностью. Полагается, что при коротких сроках обогащения изменения выявляются более надежно, а при длительных сроках (3 мес. и более) за счет возможного включения механизмов гомеостатической регуляции интенсивности синаптической передачи, различия не выявляются. Известно, что нейроны способны оценивать изменения собственной частоты разрядов через кальций зависимые сенсоры, которые регулируют рецепторный трафик путем увеличения или уменьшения аккумуляции глутаматных рецепторов на синаптических контактах [74]. Отсутствие различий может быть также связано с тем, что *ex vivo* срезы мозга не так хорошо подходят для измерения изменений синаптической активности, как измерения *in vivo*.

Длительные пластические изменения синаптической активности определяют с помощью индукции ДП и ДД. ОС может влиять на ДП и ДД по-разному. Если обучение и ДП имеют общие механизмы, а ОС изменяет силу синаптической передачи, то тогда она может вызывать окклюзию последующей индукции ДП. Альтернативно, ОС может включать и усиливать пластические механизмы, которые способствуют индукции ДП/ДД

и возможность их проявления на срезах мозга. Но ОС может и не влиять на пластичность, в этом случае изменения ДП/ДД отсутствуют. Противоречие между усилением на срезах синаптической передачи в 3Ф гиппокампа и одновременно ослабление ДП у животных, содержащихся в ОС, объясняется тем, что ОС с одной стороны активизирует механизм ДП, а с другой, вызывает окклюзию ее дальнейшего развития под влиянием электрической стимуляции [75]. Пластические перестройки под влиянием ОС, которые усиливают ДП/ДД нейронов поля СА1 гиппокампа, были обнаружены в работе [76]. Авторы исследовали ДП и ДД нейронов поля СА1 на срезах гиппокампа у крыс после 5 нед. содержания в условиях ОС. ДП и ДД усиливались у группы крыс, содержащихся в ОС, по сравнению с контрольными крысами того же возраста. Это облегчение объясняется усилением синаптической передачи, поскольку ОС уменьшала парную фасилитацию и увеличивала пресинаптическую активность. Она уменьшала число стимулов в 100-Hz пачке, требуемых для индукции ДП. Повторные индукции ДП и ДД вызывали изменения синаптической передачи у группы крыс, содержащихся в ОС, в большей степени, чем у контрольных животных [76]. У. Абрахам и соавт. [77] показали *in vivo*, что высокочастотная стимуляция 3Ф вызывает ДП, которая продолжается месяцами. Индукция стабильной ДП зависела от параметров высокочастотной стимуляции и была связана с фосфорилированием CREB (cAMP response element-binding protein). Длительное поддержание ДП зависело от условий содержания животных. Она ослаблялась под влиянием повторных помещений животных в ОС, начиная с 14-го дня после высокочастотной стимуляции. Но, в конечном счете, ДП консолидировалась, так что помещение крыс в ОС после 90 дней уже больше не изменяло ДП. В другой работе из той же лаборатории [78] и тоже *in vivo* исследовали реверсию ДП и ДД, продолжавшихся в течение нескольких недель в латеральном перфорантном пути у свободно-передвигающихся крыс линии Спрейг–Дуоли. ДП быстро подвергалась реверсии в течение нескольких минут под влиянием высокочастотной стимуляции медиального перфорантного пути. Реверсия ДП также происходила, но медленнее и слабее, в том случае, когда животные в течение 1–3 нед. содержались в условиях ОС, причем в ночное время. В работе [79] *in vivo* на взрослых крысах-самцах исследовали влияние ОС на синаптическую передачу в гиппокампе при расположении регистрирующих и стимулирующих электродов в поле СА1 гиппокампа. После стабильной регистрации возбудительных ВПСП 3-х недельная ночная процедура обогащения (в дневное время крысы, находились в домашних клетках) приводила к усилению ответов при высокой интенсивности стимуляции и к

уменьшению ответов при слабой силе тока. На поведенческом уровне влияние ОС приводило к улучшению обучения и пространственной памяти. Таким образом, процедура ночного ОС модулировала эффективность синаптической передачи в поле СА1 гиппокампа в зависимости от силы стимуляции, и могла участвовать в процессе обработки информации, используемой для пространственного обучения [79].

В ранних работах было показано, что под влиянием ОС у старых крыс (14–32 мес.) и мышей (10–17 мес.) ДП не изменяется [80, 81]. Но в более поздней работе [82] ОС в течение 1 мес. вызывала улучшение гиппокамп-зависимого обучения, пространственной памяти и mGluR-зависимой ДП у старых (23–24 мес.) крыс-самцов линии Фишер. Это происходило за счет усиления активности mGluR5 (метаботропный глутаматный рецептор 5), Homer1c (протеин, концентрирующийся в постсинаптических структурах) и p70S6 киназы. Участие mGlu5 в усилении синаптической активности гиппокампа под влиянием ОС было показано в работе [83]. Блокада mGlu5 рецепторов дозо-зависимо ослабляла раннюю фазу ДП (менее 4 ч) в поле СА1 гиппокампа у молодых (3–4 мес.) мышей. Ослаблялись также поздние компоненты ДП (больше 24-х ч), но эти компоненты у старых мышей (10–14 мес.) были менее чувствительны к блокаде mGlu5 рецепторов. На раннюю фазу ДП гиппокампа (до 2-х ч) блокада mGlu5 рецепторов не влияла ни у молодых, ни у старых мышей. ОС усиливала раннюю фазу ДП у молодых и старых животных, но не влияла на длительность синаптической потенциации и на индукцию ДП. Улучшение синаптической активности под влиянием ОС блокировалось антагонистами mGlu5 рецепторов [83]. Направление изменений ДП под влиянием ОС зависело от места ее регистрации в гиппокампе. Когда регистрация ДП осуществлялась с нейронов 3Ф в ответ на высокочастотную стимуляцию перфорантного пути, то ОС вызывала уменьшение потенциации вызванных ответов [66, 68]. Напротив, если регистрация ДП проводилась в поле СА1 гиппокампа в ответ на высокочастотную стимуляцию коллатералей Шаффера, то потенциация под влиянием ОС, как правило, усиливалась [84]. В последнем случае это происходило только тогда, когда крысы содержались в условиях ОС в течение 8 нед. до начала опытов с тетанизацией. Она не проявлялась при содержании крыс в условиях ОС среды менее двух недель [84]. Таким образом, в зависимости от временных отношений применения высокочастотной стимуляции, вызывающей ДП, и под влиянием ОС, на уровне синапсов гиппокампа, вероятно, происходит взаимодействие эффектов двух этих факторов, в результате по величине и продолжительности ДП можно судить о вкладе каждого из них в процесс синаптической переда-

чи. При усилении ДП, вероятно, происходит синергичное влияние высокочастотной стимуляции и ОС. Т. Фостер и Т. Думас [67] связывают усиление синаптической передачи в звене СА3–СА1 с увеличением активности АМРА рецепторов и взаимодействием с механизмами индукции ДП. Надо отметить, что ДП в поле СА1 оказалась более резистентной к факторам среды, поскольку спустя 24 ч после последнего помещения животных в ОС она снова восстанавливалась, чего не наблюдалось при ДП в звене перфорантный путь–3Ф. Возможно, это связано с тем, что ОС среда оказывает более сильное влияние на синаптическую передачу на уровне перфорантный путь–3Ф. В опытах Д. Сиерро-Меркадо и соавт. [85] у старых крыс ДП в 3Ф на стимуляцию медиального перфорантного пути была достоверно меньше, чем у молодых крыс. Однако кратковременное помещение старых крыс в новую обстановку непосредственно перед высокочастотной стимуляцией нивелировало эту разницу. ДП у них в новой обстановке была примерно такой же, как ДП молодых крыс в условиях регистрации в домашней клетке [85].

Трансгенные животные. Один из возможных механизмов влияния ОС на ДП гиппокампа может быть связан с увеличением в гиппокампе нейрограна (НГ), субстрата протеинкиназы С. Уменьшение содержания НГ приводило к серьезным нарушениям пространственного обучения и развития ДП в поле СА1 гиппокампа. В опытах Ф. Хуна и соавт. [86] мыши трех линий – нормальные НГ+/+, гетерозиготные НГ+/- и нокаутные НГ-/-, содержались в стандартной домашней клетке и в ОС в течение трех недель. У нормальных и гетерозиготных мышей (НГ+/+ и НГ+/-), выдержанных в ОС, ДП в поле СА1 в ответ на высокочастотную стимуляцию была лучше выражена, чем у мышей тех же линий, но содержавшихся в стандартных условиях. У мышей первых двух групп по сравнению с контрольными животными наблюдались лучшие поведенческие показатели в водном лабиринте Морриса и в тесте на условнорефлекторную реакцию страха (fear conditioning). В гиппокампе “обогащенных” групп всех трех генотипических линий с помощью методики иммуноблотинга было выявлено достоверное увеличение экспрессии CaMKII и CREB, но не ERKs (extracellular signal regulated kinases) [86]. Иммунореактивность CaMKII у нокаутных мышей составляла $114.1 \pm 4.2\%$ ($p < 0.001$), а иммунореактивность CREB – $110 \pm 2.8\%$ ($p < 0.001$) от значений контрольных мышей. У нормальных и гетерозиготных мышей под влиянием ОС происходило существенное увеличение в гиппокампе нейрограна, что, по мнению авторов, может свидетельствовать о его облегчающем влиянии на ДП в поле СА1 и когнитивные функции. В другой работе тех же авторов [87] при более продолжительном выдерживании

мышей (более 10 нед.) в ОС когнитивные функции улучшались у всех животных трех линий, включая нокаутных, но ДП в поле СА1 гиппокампа в ответ на высокочастотную стимуляцию у мышей с отсутствием НГ не возникала. Хорошо известно, что ДП гиппокампа зависит от состояния глутаматных NMDA-рецепторов [88] и прежде всего от активности двух основных их субъединиц – NR2A и NR2B [89, 90]. Работы на трансгенных мышцах с оверэкспрессией субъединицы NR2B NMDA-рецепторов в передних отделах мозга показали важный вклад этой субъединицы в индукцию ДП гиппокампа и проявление когнитивных функций [91]. Ю.П. Тэн и соавт. [91] исследовали влияние ОС у трансгенных мышей с оверэкспрессией NR2B субъединицы NMDA-рецепторов в нейронах переднего мозга. Предполагалось, что вовлечение NMDA-рецепторов в условиях ОС усилит ДП гиппокампа, а также улучшит обучение и память. У содержащихся в стандартной среде NR2B трансгенных мышей усиление ДП в гиппокампе и улучшение когнитивных функций вызывалось даже через 10–12 поколений. У контрольных мышей обогащение приводило к улучшению контекстуального и сигнального обусловливания, узнавания новых предметов в повторных тестах, облегчению угашения реакции страха. У NR2B трансгенных мышей обогащение не вызывало усиления отмеченных реакций. По мнению авторов, этого не происходило под влиянием ОС в силу у достигших трансгенных мышей эффектов насыщения, т.е. достижения верхней границы возможного влияния. Следует, однако, отметить, что в тестах на узнавание у трансгенных мышей память на знакомые предметы в ОС сохранялась дольше (одну неделю против 3 дней), чем у трансгенных мышей, содержащихся в стандартной обстановке. Обогащение увеличивало уровень протеинов в GluR1, NR2B и NR2A субъединицах глутаматных рецепторов у мышей обеих групп, что указывает на то, что усиление обучения и памяти у трансгенных мышей обусловлено влиянием как генетических, так и обстановочных факторов. У трансгенных мышей α -CaMKII(T286A) ДП в поле СА1 на стимуляцию коллатералей Шаффера не проявлялась [92]. У этих мышей зона мутации (T286A), расположенная в альфа субъединице кальций-зависимой кальмодулин киназы II, препятствует аутофосфорилированию в этой зоне. Аутофосфорилирование в участке T286 позволяет киназе оставаться автономно активной в отсутствие кальция/кальмодулина [93]. У мутантных мышей α -CaMKII(T286A) из-за нарушения аутофосфорилирования на участке T286 утрачивается кальций/кальмодулин независимая активность. С. Парсли и соавт. [92] предположили, что если ДП является нейрофизиологическим субстратом обучения, то ОС должна влиять на процесс обучения у контрольных мы-

шей, поскольку в условиях такой среды у них существенно меняется ДП гиппокампа. Напротив, у мутантных мышей $\alpha\text{CaMKII}\beta\text{T286A}$, у которых ДП не проявляется, таких изменений быть не должно. Однако гипотеза не подтвердилась, а были получены прямо противоположные результаты: под влиянием ОС изменения вызывались у мутантных мышей и не вызывались у контрольных. Авторы полагают, что ОС вызывает αCaMKII -независимые изменения у мышей обеих групп. Однако впоследствии эти изменения реверсируются у контрольных мышей через αCaMKII -зависимые механизмы, через которые реализуется ДП. Реверсия синаптической пластичности в гиппокампе облегчает его участие в процессах обучения и памяти. Неспособность к реверсии синаптической пластичности у $\alpha\text{CaMKII}\beta\text{T286A}$ мышей приводит к драматическому ослаблению у них способности к обучению и памяти [92].

Нейрохимические механизмы. Опыты на трансгенных мышцах позволяют сделать некоторые выводы в отношении механизмов, с помощью которых ОС влияет на индукцию и сохранение ДП. Причем если влияние тех или иных генов путем их выключения или оверэкспрессии было определенным, то влияние взаимодействия ОС и отдельных участков генома (или отдельных генов) не было столь очевидным. Помимо трансгенных мышей для выявления механизмов действия обогащенной среды на ДП используются также нейрофармакологические подходы, направленные на активацию или подавление активности определенных рецепторов. Так, Т. Фостер и соавт. [68] в опытах на срезах показали, что в зависимости от условий содержания животных — либо в индивидуальных клетках, ОС — наблюдается существенная разница в проявлениях ДП в звене перфорантный путь—3Ф. В условиях ОС синаптические процессы усиливались, а ДП как результат взаимодействия высокочастотной стимуляции перфорантного пути и ОС уменьшалась. Использование антагониста NMDA рецепторов AP5 приводило к ослаблению синаптических процессов в указанном звене, что свидетельствует об опосредованном влиянии ОС на синаптическую передачу через NMDA рецепторы. С. Васута и соавт. [94] использовали специфические антагонисты к отдельным субъединицам NMDA рецепторов у мышей линии C57Bl/6 при побежках в колесе (как форме обогащения) и при стандартных условиях содержания. В их опытах на срезах было показано, что ДП в зубчатой фасции значительно лучше проявляется у бегунов, но существенно уменьшается у животных двух групп под влиянием антагониста NR2B субъединицы NMDA рецепторов. При использовании специфического антагониста к NR2A субъединице NMDA рецепторов, NVP AAM077, ДП значительно подавлялась у бегунов и лишь слегка у мышей, содержащихся в обыч-

ных условиях. Эти результаты свидетельствуют о том, что хотя ДП опосредуется через активацию обоих типов NR2B и NR2A NMDA рецепторов, ОС действует преимущественно через активацию NR2A субъединицы. В работе [95] показано, что ОС модулирует mRNA экспрессию транспортера глутамата EAAC1, уровень которого в гиппокампе существенно снижается, а mRNA экспрессия NMDA рецепторов после обогащения значительно возрастает. mRNA экспрессия AMPA рецепторов в гиппокампе под влиянием ОС не изменялась. Однако в другой работе [96] ОС усиливала экспрессию РНК для субъединиц GluR2 и GluR4 AMPA рецепторов в гиппокампе по сравнению с контрольными мышцами. Хорошо известно, что ДП в поле CA1 гиппокампа зависит от активности циклической аденозинмонофосфат/протеинкиназы A [cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (сAMP/РКА)]. Торможение протеинкиназы А (ПКА) ухудшает сохранение ДП на высокочастотную стимуляцию [97], но не изменяет эффекты низкочастотной стимуляции. С. Даффи и соавт. [84] показали, что ОС влияет на ДП в поле CA1 гиппокампа через изменение эффектов ПКА. Использование ингибитора ПКА, Rp cAMPS (Rp adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate triethylamine) в их опытах уменьшало ДП в поле CA1 на высокочастотную стимуляцию коллатералей Шаффера *in vitro* у мышей, содержащихся в обогащенной среде [84]. По мнению авторов, ОС изменяет активационно-зависимые пороги сAMP/РКА сигнальных путей при раздражении мозга или иных воздействиях.

ВЛИЯНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ НА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ

В большинстве работ показано, что пребывание животных в ОС улучшает обучение и память во многих экспериментальных моделях поведения. Подобно молекулярно-клеточным, электрофизиологическим, нейрохимическим и другим изменениям, под влиянием ОС происходят существенные изменения в поведении, и, прежде всего, обучении и памяти. Рассмотрим некоторые из них на примере конкретных исследований. Однако сразу отметим, что из-за нехватки места мы ограничимся здесь описанием только гиппокамп-зависимого пространственного обучения, и главным образом у грызунов. Существенный вклад в понимании влияний ОС на пространственное обучение и память у мышей внесли работы лаборатории Карин Фрик и ее коллег. Так, в работе [98] самцы и самки мышей линии C57BL/6 разного возраста (7 и 18 мес.) содержались в домашних клетках с двумя—тремя дополнительными игрушками и колесом для бега в течение 29 дней. После этого у мышей тестировали пространственную и сигнальную память в водном лабиринте Морриса

в течение одного экспериментального дня (редкое исследование для водного лабиринта) с 3-мя блоками по 4 пробы в каждом блоке (обучение), плюс одна тестовая проба без платформы и еще 4 пробы для проведения сигнального обучения с видимой платформой. ОС уменьшала возрастное ослабление пространственного обучения. У мышей среднего возраста, содержащихся в ОС, обучение проявилось лучше, чем у контрольных мышей того же возраста. Улучшение обучения наблюдалось в равной степени у самцов и самок. ОС не влияла на сигнальную память, все группы примерно одинаково справлялись с поиском видимой платформы. В другой работе [99] схема опытов в лабиринте Морриса была несколько иной. Мышам-самкам предъявлялось по 6 проб в день в течение 4-х дней, время пробы составляло 2 мин. Во время первых 5 проб платформа была скрыта под водой на 0.5 см, но в каждой 6-й пробе она погружалась на 20, 30 и 40 с и была недоступной для животного. В опыт брали 3 группы животных: молодых (3 мес.), старых контрольных (26–27 мес.) и старых, содержащихся в ОС по 3 ч в день, начиная с 14 дня (включая время опытов), всего 23 дня. Все показатели (латентность, пройденная дистанция и др.) пространственного обучения у группы старых мышей, которым предъявлялась ОС, существенно улучшались по сравнению с контрольными старыми мышами [99], занимая промежуточное положение между старыми и молодыми мышами. Как и в предыдущей работе, сигнальная память существенно не изменялась под влиянием ОС. Таким образом, как продолжительная (около месяца), так и короткая (по 3 ч в день) ОС улучшала пространственное обучение в лабиринте Морриса у старых мышей линии C57BL/6, правда, во втором случае исследование проводилось только у самок. Чтобы сопоставить влияние короткой и продолжительной ОС на обучение и память у самцов, Дж. Беннетт и соавт. [100] провели опыты с пространственным обучением на 5 группах крыс: двух контрольных, старых и молодых, и трех группах, которым предъявлялась разная по времени процедура ОС. С одной из них проводился просто хендлинг по 5 мин в день. Вторая группа содержалась в ОС по 3 ч в день, как в работе [99] на самках, и третья группа находилась в ОС постоянно, время обогащения составляло 10 нед. Хуже всего пространственное обучение в лабиринте Морриса проявилось у старых контрольных мышей, лучше всего у молодых. Только длительное пребывание в ОС старых мышей приводило к значительному сокращению времени нахождения скрытой платформы, кривая обучения у них приближалась к кривой обучения молодых мышей. Несмотря на эти различия, уровень синаптофизина во фронто-париетальной коре, гиппокампе и стриатуме у крыс с продолжительным пребыванием в ОС был ниже, чем у

молодых и старых контрольных крыс, что, по мнению авторов, свидетельствует об обратных взаимоотношениях уровня синаптофизина и состояния пространственной памяти у старых мышей [100]. Еще в одной работе мышей линии C57/BL/6 [101] помещали в ОС в возрасте 35–94 дня или 100–159 дней жизни. ОС улучшала обучение в лабиринте Морриса, особенно при обогащении в раннем возрасте с усилением иммунореактивности CREB в гиппокампе. В работе [102] исследовали влияние ОС (40 дней) на поведение в водном бассейне Морриса — давали 4 пробы в день, с интервалом в 30 мин, в течение 7 последовательных дней. После этого проводили несколько тестовых проб после 1-го дня обучения, повторно после 10-го, 20-го, 30-го и 50-го дня. После каждой пробы измеряли экспрессию раннего гена *c-Fos* с помощью иммуногистохимии, как индикатора нейрональной активности. Было обнаружено, что активация медиальной префронтальной коры играет важнейшую роль в процессах отдаленной пространственной памяти. ОС укорачивала время ее вовлечения в процесс консолидации пространственной памяти и вызывала прогрессивную активацию распределенной корковой сети, которая не вовлекалась у контрольных мышей. Причем, происходило не только ускоренное вовлечение медиальной префронтальной коры в процесс консолидации памяти, но и расширялись корковые области, вовлеченные в этот процесс [102]. Как уже сообщалось, ОС влияла на обучение и память не только при длительных, но и при коротких размещениях животных в ОС [103]. Молодым самкам мышей линии C57BL/6 добавляли в клетку ежедневно по 3 ч резиновые игрушки, имитирующие грызунов (когнитивная стимуляция) или колесо для бега (физические упражнения), или ежедневно подвергали акробатическим (выполнение стереотипных действий) тренировкам в течение 6 нед. У мышей разных групп исследовали рабочую и долгосрочную память в водном радиальном лабиринте. Только физические упражнения, но не когнитивная стимуляция и акробатические тренировки, вызывали у мышей улучшение пространственной рабочей памяти относительно контрольной группы, несмотря на то, что уровень синаптофизина был повышен у всех групп животных в новой коре и гиппокампе [103]. Улучшение пространственного обучения крыс под влиянием ОС совпадало с усилением нейрогенеза [104]. Трудно сказать, за счет каких новых клеток происходило это улучшение, поскольку отношение нейрогенеза и глиогенеза существенно не зависело от условий содержания крыс. Ф. Фукс и соавт. [105] исследовали на старых крысах влияние позднего обогащения на обучение и память. Вначале они проверяли состояние памяти в лабиринте Морриса у двух групп 17-и месячных самок — у одних долгосрочная память проявлялась хорошо, у других

плохо. Затем, через 7 мес. у этих групп снова тестировали состояние пространственной долговременной памяти сразу после окончания повторного обучения (недавняя память) и спустя 10 дней после него (отдаленная память). У крыс с хорошей памятью, и содержащихся в стандартных условиях, за 7 прошедших месяцев память во втором тесте значительно ухудшилась. У крыс с хорошей памятью, но содержащихся в ОС, как недавняя, так и отдаленная память поддерживались на хорошем уровне. Хотя у крыс с плохой памятью, но содержащихся в ОС, спустя 7 мес., недавняя память слегка улучшилась, обучение у этой группы было намного хуже, чем у группы с хорошей памятью. Это говорит о том, что ОС не улучшает память у крыс с уже наступившими когнитивными расстройствами. У контрольных крыс под влиянием ОС, несмотря на возраст, память существенно улучшалась [105]. Этим данным, однако, противоречат недавние результаты на крысах, полученные в работе [106]. Коротко, суть их в том, что ОС и в старом возрасте может оказывать благотворное влияние на ослабленные когнитивные функции. Авторы разделили крыс по способности к обучению в водном лабиринте Морриса в возрасте 12 мес. на “отличников” и “двоечников” (в ходе обучения), и на “отстающих” и “не отстающих” (в процессе тестовой пробы). После 12 мес. пребывания в ОС у крыс повторно исследовали поведение в лабиринте Морриса. “Отличники” и “не отстающие” в возрасте 21-го месяца после ОС продолжали иметь хорошую долгосрочную память и обучение. Интересно, что у “двоечников” и “отстающих” крыс в результате действия ОС обучение и память улучшились, что означает, что и в старом возрасте имеются еще остаточные функциональные резервы для частичного восстановления когнитивных функций, которые стимулирует ОС [106]. Самки крыс линии Long Evans, начиная с 1-го месяца, постоянно содержались в ОС, после чего в 3 мес. (молодые), в 12 мес. (средний возраст) и в 24 мес. (старые) у них исследовали способности к обучению в лабиринте Морриса и степень внимания с помощью 5-и местной дифференцировки. ОС вызвала улучшение обучения у всех групп крыс по сравнению с контрольными животными, но внимание улучшалось только у старых крыс [107]. Во всех рассмотренных работах ОС улучшала пространственную память и обучение у старых крыс. Но также позитивно ОС влияла на молодых животных, улучшая у них пространственную память и синаптические функции [108]. Двухмесячных крыс содержали в ОС, усиленной предметами, и в ОС, усиленной социальными взаимоотношениями, а также в стандартных условиях в течение 1-го месяца. Обе группы, содержащиеся в ОС, проявляли лучшие показатели обучения в водном лабиринте Морриса (особенно по пройденному расстоянию), чем крысы, содер-

жавшиеся в стандартных условиях. Но продолжение пребывания в ОС до 4-х месяцев улучшало обучение у крыс с увеличенным числом предметов в клетке, по сравнению с двумя другими группами. Кроме того, у них была лучше выражена ДП гиппокампа, которая зависела от mGluR5 сигналинга, активации ERK и mTOR сигнальных путей и фосфорилиции p70s6 киназы [108].

ОБОГАЩЕННАЯ СРЕДА И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В очень многих работах показано благотворное влияние обогащенной среды на течение уже возникших заболеваний или ее положительное значение для предупреждения новых болезней. Причины такого позитивного влияния ОС на многие заболевания связаны с тем, что она стимулирует организм, актуализируя его двигательные, сенсорные, мотивационные, когнитивные и другие функции. Бездействие и недостаточное проявление этих функций ведет к ослаблению организма, плохому настроению, расстройствам сна и аппетита, к развитию психических и соматических расстройств. И, наоборот, упражнения, тренировки и закаливания этих функций не только способствуют нормальной работе целостных функциональных систем [109, 110], но и усложняют возможности сбоя их работы под влиянием экстремальных условий и стрессов. ОС — это очень важный инструмент взаимодействия организма с внешней средой, через обогащение среды происходят позитивные пластические перестройки в организме, которые способны изменить структуру в зависимости от текущей потребности организма. Рассмотрим несколько экспериментальных примеров, в которых ОС оказывает благотворное влияние на течение заболевания. В частности, ОС оказывает позитивное влияние на поведенческие, клеточные и молекулярные аспекты патогенеза болезни Альцгеймера на моделях трансгенных мышей, имитирующих заболевание. Для этой цели используются разные трансгенные мыши: трансгены для apoE3 человека [111]; мыши ко-экспрессирующие мутантный APP и пресенилин 1 (PS1) [112, 113]; APPsw трансгенная мышь [114]. Достаточно только одних физических упражнений, чтобы вызвать положительные эффекты [115]. Показано, что у трансгенных мышей с предшественником амилоидного протеина APP-23, выращенных в условиях ОС, улучшалось обучение в водном лабиринте Морриса, усиливались нейротрофин 3, BDNF и нейрогенез [116]. Трансгенные мыши, экспрессирующие человеческий мутантный пресенилин 1 и предшественник амилоидного протеина (PS1/PDAPP), превосходили мышей, бывших в стандартных условиях, в ряде поведенческих тестов (водный лабиринт Морриса, водный радиальный лабиринт), если их выращивали в ОС

до 6-месячного возраста. Трансгенные мыши поведенчески практически не отличались от не-трансгенных мышей [117]. На таких же трансгенных мышах было показано, что все факторы, используемые для ОС (с 1 до 9-и мес.), способны предупредить развитие когнитивных, молекулярных и биохимических нарушений, возникающих при болезни Альцгеймера. Усиления одного только социального взаимодействия оказывается недостаточным, чтобы приостановить или облегчить течение заболевания [118]. Недавно было показано, что ОС, с помощью физической активности и усиления социальных отношений, способна на трансгенных мышах, моделирующих болезнь Альцгеймера, с оверэкспрессией только A β ₄₋₄₂ пептидов, сохранить пространственную память и предохранить двигательные расстройства [119].

Показано также, что ОС может замедлить развитие болезни Паркинсона, вызванного токсином MPTP у мышей линии C57BL/6. Эти мыши на 200% более резистентны к действию MPTP, чем контрольные животные [120]. После введения MPTP контрольные мыши теряли 75% дофаминовых нейронов, а мыши группы ОС только 40%. Показано, что у мышей, содержащихся в ОС и получавших MPTP, по сравнению с мышами, получавшими MPTP и бывшими в стандартных условиях, существенно снижалась экспрессия proNGF и p75 нейротрофинового рецептора (neurotrophin receptor p75^{NTR}) [121]. Авторы полагают, что нейропротекторное влияние ОС на дофаминовые нейроны реализуются через подавление активации p75^{NTR}-сигнальных путей посредством связывания proNGF и p75^{NTR}.

Очень много работ посвящено позитивному влиянию разных аспектов ОС на депрессивное состояние человека и депрессивно-подобное поведение в модельных экспериментах на животных. Поисковая система “Pubmed” выдает 548 работ на связку слов “environmental enrichment and depression”. В этих работах описывается не только феноменология связи ОС и депрессии, но и различные механизмы, с помощью которых ОС препятствует развитию и облегчает течение заболевания. Ранее мы уже детально описывали механизмы развития хронического стресса и депрессивных расстройств [122–124]. Многие из этих механизмов корректируются ОС в сторону проявления положительных эффектов. К сожалению, из-за нехватки места мы не можем останавливаться здесь на этих и других аспектах, связанных с психическими отклонениями нормального поведения и их коррекции с помощью ОС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, обогащение среды включает в себя три основных компонента. Первый компонент — это

сенсорное обогащение. Оно связано с наполнением окружающей обстановки разнообразными предметами, которые становятся объектами для сенсорного восприятия и последующих манипуляций с ними. В реальной жизни животные и человек используют предметы внешней обстановки для ориентации в пространстве и формирования на их основе сенсорных энграм памяти, которые используются для поиска пищи, воды, сексуального партнера, избегания врага и других адаптивных действий. При недостатке сенсорной стимуляции слабо развивается память, не выполняются полезно-приспособительные действия, жизнь становится вялой, скучной и однообразной. Еще И.П. Павлов более 100 лет назад обратил внимание на бессилие и полное безразличие собак к окружающему миру при экстирпации коры больших полушарий, в которых расположены центральные представительства сенсорных систем. При активации этих систем, их интеграции с возбуждением подкорковых лимбических и других структур мозга формируется целостное приспособительное поведение — выполняются различные действия, возникают эмоциональные ощущения, обогащается память, а вместе с ней и сама жизнь. Понятно поэтому, какое немаловажное значение для организма имеет компонент ОС “сенсорное обогащение” или сенсорная стимуляция. Второй компонент ОС — социальная стимуляция, или необходимость пребывания в сообществе себе подобных. Благотворное влияние этого компонента особенно очевидно при наблюдении за животными и человеком, находящимися в социальной изоляции. Длительная социальная изоляция является сильным психоэмоциональным стрессом, который ведет к тяжелым последствиям для организма, от серьезных заболеваний с нарушением когнитивных функций (болезнь Альцгеймера) до мучительных депрессивных расстройств, нередко заканчивающихся суицидами. Недавно, мы в обзорной работе [125] подробно описали молекулярно-клеточные и другие механизмы развития тревожного и депрессивно-подобного поведения под влиянием социальной изоляции у животных и показали роль в этих механизмах стресса, нейровоспаления, BDNF, нейрогенеза, синаптической пластичности, моноаминов и т.д. Примечательно, что изменения в этих механизмах под влиянием социальной изоляции прямо противоположны тем, которые наблюдаются под влиянием обогащенной среды. Третий компонент ОС — это физическая активность, или выполнение конкретных физических действий (например, бег в колесе), которые, судя по некоторым данным, оказываются даже более эффективными в положительных влияниях ОС, например, в индукции нейрогенеза, синаптической активности, чем другие ее компоненты. Физические действия согласно ранним бихевиористским воззрениям

являются неотъемлемой частью формирования стимульно-моторных связей (S–R connection) или энграм. В разработанной нами много лет назад [109, 110] концепции функциональной системы, двигательные энграммы составляют в ней звено моторно-подкрепляющей подсистемы. В аппарате памяти сенсорные и моторные энграммы связаны между собой комплементарно (по принципу ключ-замок). Через эти комплементарные связи информация передается от сенсорно-мотивационной к моторно-подкрепляющей подсистеме. Итогом является завершение подкрепляющего действия (см. подробно [109, 110]). Таким образом, ОС активирует и стимулирует работу всей функциональной системы – от восприятия и переработки сенсорной информации, до актуализации стимульно-моторных энграм, хранящихся в аппарате памяти, и работы двигательных механизмов, нацеленных на получение полезно-приспособительного результата. В этом смысле ОС выступает в роли очень ценного активатора функциональной системы, который переводит организм из спокойного вялого состояния в активный и деятельный рабочий механизм.

Если теперь вкратце обобщить все изложенное выше, то можно сделать следующее заключение. ОС вызывает серьезные пластические перестройки в организме, которые, прежде всего, отражаются в усилении нейрогенеза субгранулярного слоя 3Ф гиппокампа. На нейрогенез влияют разные компоненты ОС, вызывая усиление пролиферации новорожденных клеток и улучшение их выживаемости. При этом вновь рожденные клетки интегрируются в систему как нейронов, так и глиальных клеток гиппокампа. Увеличение нейрогенеза под влиянием ОС коррелирует с улучшением обучения/пространственной памяти и усилением длительной потенциации гиппокампа. ОС влияет на нейрогенез через ядерный фермент MSK1 посредством down regulation сигнальных путей BDNF и MAPK. Под влиянием ОС происходит усиление экспрессии BDNF рецептора, TrkB, более легкое связывание его с BDNF и запуск внутриклеточного сигнального каскада. ОС облегчает фосфорилирование протеин киназы B (Akt) и уменьшает активность гликоген синтазы киназы бета (GSK3 β), которая снижает интенсивность тау фосфорилирования. В результате усиления BDNF и его связи с рецептором TrkB активируются MAPK (Ras/Raf/MEK/MAPK), и RSK2/MSK пути. Происходит также активирование NMDAR-индуцируемой Ca²⁺/калмодулин-зависимой протеин киназы, которое ведет к усилению фосфорилирования CREB и регуляции экспрессии генов, необходимых для формирования долговременной памяти. Обогащенная среда вызывает микроструктурные изменения синаптического аппарата (синаптогенез). Она влияет на количество синаптических контактов, разветвленность дендритного дерева и

плотность дендритных шипиков в гиппокампе и других структурах мозга. ОС увеличивает уровень пресинаптического протеина, синаптофизина в гиппокампе и фронто-париетальной коре и постсинаптического протеина, PSD 95 во многих структурах мозга. Под ее влиянием происходит усиление синаптической передачи в звене перфорантный путь-3Ф и звене коллатерали Шаффера-пирамидные нейроны поля CA1 в зависимости от возраста, с которого начинается обогащение среды, ее продолжительности, возраста и вида животного, места расположения регистрируемых и стимулируемых электродов, проведения опытов *in vitro*, *ex vivo*, или *in vivo* и других факторов. Пластические синаптические перестройки под влиянием ОС связаны с механизмами активации NMDA рецепторов (субъединицы NR2A и NR2B), AMPA-рецепторов (субъединицы GluR2 и GluR4), метаботропного глутаматного рецептора 5 (mGluR5), CaMKII, фосфорилирования CREB, активности MSK1, нейтрогенина и др. Обогащенная среда существенно улучшает обучение и пространственную гиппокамп-зависимую память. Это происходит при малой и большой продолжительности действия ОС, при постоянном содержании, или при многократных коротких размещениях в ней животных, у мышей и крыс, у молодых и старых животных, при обогащении в молодом и старом возрасте и т.д. Причем на положительный результат практически не влияет процедура опытов пространственного обучения в водном лабиринте Морриса, несмотря на то, что она слабо стандартизирована и каждый исследователь проводит опыты практически по собственной схеме. Улучшение поведения под влиянием ОС происходит не только у нормальных животных, но и у животных в модельных экспериментах с различными нарушениями когнитивных, сенсорных и двигательных функций. Обогащенная среда уменьшает степень этих нарушений, иногда до уровня контрольных животных.

Таким образом, ОС оказывает благотворное целительное действие на организм, начиная от положительных молекулярно-клеточных, биохимических и синаптических преобразований, до улучшения и выправления целостных эмоциональных, когнитивных, и поведенческих функций.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантом РФФИ (проект № 19-015-00129А) и средствами государственного бюджета по госзаданию на 2019–2021 гг. (№ г.р. АААА-А17-117092040002-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hebb D.* // American Psychologist. 1947. V. 2. P. 306–307.
2. *Rosenzweig M.R., Krech D., Bennett E.L., Diamond M.C.* // J. Comparative and Physiological Psychology. 1962. V. 55. P. 429–437.
3. *Bennett E.L., Rosenzweig M.R., Diamond M.C.* // Science. 1969. V. 163. P. 825–826.
4. *Diamond M.C., Law F., Rhodes H., Lindner B., Rosenzweig M.R., Krech D., Bennett E.L.* // J. Comparative Neurology. 1966. V. 128. № 1. P. 117–126.
5. *Krech D., Rosenzweig M.R., Bennett E.L.* // J. Comparative and Physiological Psychology. 1960. V. 53. P. 509–519.
6. *Kempermann G.* // Nat. Rev. Neurosci. 2019. V. 20. № 4. P. 235–245.
7. *Clemenson G.L., Gage F.H., Craig E.L., Stark G.E.L.* // Environmental Enrichment and Neuronal Plasticity / Ed. by *Moses V. Chao*. The Oxford Handbook Online. 2018. P. 1–42.
8. *Clemenson G.D., Deng W., Gage F.H.* // Current Opinion in Behavioral Sciences. 2015. V. 4. P. 56–62.
9. *Van Praag H., Kempermann G., Gage F.H.* // Nat. Neurosci. 1999. V. 2. P. 266–270.
10. *Vivar C., Potter M.C., van Praag H.* // Curr.Top.Behav.Neurosci. 2013. V. 15. P. 189–210.
11. *van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H.* // Nature. 2002. V. 415. № 6875. P. 1030–1034.
12. *van Praag H., Christie B.R., Sejnowski T.J., Gage F.H.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 23. P. 13427–13431.
13. *Kobilo T., Liu Q.R., Gandhi K., Mughal M., Shaham Y., van Praag H.* // Learn. Mem. 2011. V. 18. № 9. P. 605–609.
14. *Mustroph M.L., Chen S., Desai S.C., Cay E.B., DeYoung E.K., Rhodes J.S.* // Neuroscience. 2012. V. 219. P. 62–71.
15. *Clemenson G.D., Lee S.W., Deng W., Barrera V.R., Iwamoto K.S., Fanselow M.S., Gage F.H.* // Hippocampus. 2015. V. 25. № 3. P. 385–92.
16. *Birch A.M., McGarry N.B., Kelly A.M.* // Hippocampus. 2013. V. 23. № 6. P. 437–450.
17. *Freund J., Brandmaier A.M., Lewejohann L., Kirste I., Kritzler M., Krüger A., Sachser N., Lindenberger U., Kempermann G.* // Science. 2013. V. 340. № 6133. P. 756–759.
18. *Fabel K., Wolf S.A., Ehninger D., Babu H., Leal-Galicia P., Kempermann G.* // Front. Neurosci. 2009. V. 3. P. 1–5.
19. *Freund J., Brandmaier A.M., Lewejohann L., Kirste I., Kritzler M., Krüger A., Sachser N., Lindenberger U., Kempermann G.* // Neuroscience. 2015. V. 309. P. 140–152.
20. *Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H.* // Nature. 1997. V. 386. № 6624. P. 493–495.
21. *Steiner B., Zurborg S., Hörster H., Fabel K., Kempermann G.* // Neuroscience. 2008. V. 154. № 2. P. 521–529.
22. *Kempermann G., Gast D., Gage F.H.* // Ann. Neurol. 2002. V. 52. P. 135–143.
23. *Tashiro A., Makino H., Gage F.H.* // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 12. P. 3252–3259.
24. *Speisman R.B., Kumar A., Rani A., Pastoriza J.M., Severance J.E., Foster T.C., Ormerod B.K.* // Neurobiol. Aging. 2013. V. 34. № 1. P. 263–274.
25. *Olateju O.I., Morè L., Arthur J.S.C., Frenguelli B.G.* // Neurosci. 2021. V. 452. P. 228–234.
26. *Privitera L., Morè L., Cooper D.D., Richardson P., Tsogka M., Hebenstreit D., Arthur J.S.C., Frenguelli B.G.* // Neurosci. 2020. V. 40. № 24. P. 4644–4660.
27. *Grońska-Peski M., Gonçalves J.T., Hébert J.M.* // J. Neurosci. 2021. 26: JN-RM-2286-20.
28. *Rizzi S., Bianchi P., Guidi S., Ciani E., Bartesaghi R.* // Brain Res. 2011. V. 1415. P. 23–33.
29. *Acheson A., Conover J.C., Fandl J.P., DeChiara T.M., Russell M., Thadani A., Squinto S.P., Yancopoulos G.D., Lindsay R.M.* // Nature. 1995. V. 374. № 6521. P. 450–453.
30. *Huang E.J., Reichardt L.F.* // Annu. Rev. Neurosci. 2001. V. 24. P. 677–736.
31. *Bekinschtein P., Oomen C.A., Saksida L.M., Bussey T.J.* // Semin. Cell Dev. Biol. 2011. V. 22. № 5. P. 536–542.
32. *Rossi C., Angelucci A., Costantin L., Braschi C., Mazzantini M., Babbini F., Fabbri M.E., Tessarollo L., Maffei L., Berardi N., Caleo M.* // Eur. J. Neurosci. 2006. V. 24. № 7. P. 1850–1856.
33. *Bergami M., Rimondini R., Santi S., Blum R., Götz M., Canossa M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 40. P. 15570–15575.
34. *Scharfman H., Goodman J., Macleod A., Phani S., Antonelli C., Croll S.* // Exp. Neurol. 2005. V. 192. № 2. P. 348–356.
35. *von Bohlen und Halbach O., Krause S., Medina D., Sciarretta C., Minichiello L., Unsicker K.* // Biol. Psychiatry. 2006. V. 59. № 9. P. 793–800.
36. *Tolwani R.J., Buckmaster P.S., Varma S., Cosgaya J.M., Wu Y., Suri C., Shooter E.M.* // Neurosci. 2002. V. 114. № 3. P. 795–805.
37. *Dong B.E., Chen H., Sakata K.J.* // Neurochem. 2020. V. 154. № 1. P. 41–55.
38. *Rojas-Carvajal M., Sequeira-Cordero A., Brenes J.C.* // Front. Pharmacol. 2020. V. 11. P. 674.
39. *Sadegzadeh F., Sakhaie N., Isazadehfar K., Saadati H.* // Neurosci. Lett. 2020. V. 732. P. 135–133.
40. *Li Y., Luikart B.W., Birnbaum S., Chen J., Kwon C.H., Kerner S.G., Bassel-Duby R., Parada L.F.* // Neuron. 2008. V. 59. № 3. P. 399–412.
41. *Hu Y.S., Long N., Pigino G., Brady S.T., Lazarov O.* // PLoS One. 2013. V. 8. № 5. e64460.
42. *Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F.H.* // J. Comp. Neurol. 2000. V. 425. № 4. P. 479–494.
43. *Fabel K., Fabel K., Tam B., Kaufer D., Baiker A., Simons N., Kuo C.J., Palmer T.D.* // Eur. J. Neurosci. 2003. V. 18. № 10. P. 2803–2812.
44. *Van der Borgh K., Kóbor-Nyakas D.E., Klauke K., Eggen B.J., Nyakas C., Van der Zee E.A., Meerlo P.* // Hippocampus. 2009. V. 19. № 10. P. 928–936.
45. *Conner J.M., Franks K.M., Titterness A.K., Russell K., Merrill D.A., Christie B.R., Sejnowski T.J., Tuszyński M.H.* // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 35. P. 10883–10889.
46. *Frielingsdorf H., Simpson D.R., Thal L.J., Pizzo D.P.* // Neurobiol. Dis. 2007. V. 26. № 1. P. 47–55.

47. Ickes B.R., Pham T.M., Sanders L.A., Albeck D.S., Mohammed A.H., Granholm A.C. // *Exp. Neurol.* 2000. V. 164. № 1. P. 45–52.
48. Neeper S.A., Gómez-Pinilla F., Choi J., Cotman C.W. // *Brain Res.* 1996. V. 726. № 1–2. P. 49–56.
49. Carro E., Nuñez A., Busiguina S., Torres-Aleman I. // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. № 8. P. 2926–2933.
50. Trejo J.L., Carro E., Torres-Aleman I. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 5. P. 1628–1634.
51. Green E.J., Greenough W.T., Schlumpf B.E. // *Brain Res.* 1983. V. 264. № 2. P. 233–240.
52. Leggio M.G., Mandolesi L., Federico F., Spirito F., Ricci B., Gelfo F., Petrosini L. // *Behav. Brain Res.* 2005. V. 163. № 1. P. 78–90.
53. Gabriel P., Mastracchio T.A., Bordner K., Jeffrey R. // *Physiol. Behav.* 2020. V. 226. P. 113–133.
54. Fiala B.A., Joyce J.N., Greenough W.T. // *Exp. Neurol.* 1978. V. 59. № 3. P. 372–383.
55. Juraska J.M., Fitch J.M., Henderson C., Rivers N. // *Brain Res.* 1985. V. 333. № 1. P. 73–80.
56. Malik R., Chattarji S.J. // *Neurophysiol.* 2012. V. 107. № 5. P. 1366–1378.
57. Rampon C., Tang Y.P., Goodhouse J., Shimizu E., Kyin M., Tsien J.Z. // *Nat. Neurosci.* 2000. V. 3. № 3. P. 238–244.
58. Wang C.J., Wu Y., Zhang Q., Yu K.W., Wang Y.Y. // *Neural Regen. Res.* 2019. V. 14. № 3. P. 462–469.
59. Rojas J.J., Deniz B.F., Miguel P.M., Diaz R., Hermel Edo E., Achaval M., Netto C.A., Pereira L.O. // *Exp. Neurol.* 2013. V. 241. P. 25–33.
60. Bindu B., Alladi P.A., Mansooralikhan B.M., Sriku-mar B.N., Raju T.R., Kutty B.M. // *Neuroscience.* 2007. V. 144. № 2. P. 412–423.
61. Frick K.M., Fernandez S.M. // *Neurobiol. Aging.* 2003. V. 24. № 4. P. 615–626.
62. Nithianantharajah J., Levis H., Murphy M. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2004. V. 81. № 3. P. 200–210.
63. Eckert M.J., Abraham W.C. // *Curr Top. Behav. Neurosci.* 2013. V. 15. P. 165–187.
64. Ohline S.M., Abraham W.C. // *Neuropharmacology.* 2019. V. 145(Pt A). P. 3–12.
65. Маркевич В.А., Григорьян Г.А. // *Журн. высш. нерв. деят.* 2009. Т. 59. № 5. С. 517–526.
66. Green E.J., Greenough W.T.J. // *Neurophysiol.* 1986. V. 55. № 4. P. 739–750.
67. Foster T.C., Dumas T.C. // *J. Neurophysiol.* 2001. V. 85. № 4. P. 1377–1383.
68. Foster T.C., Fugger H.N., Cunningham S.G. // *Brain Res.* 2000. V. 871. № 1. P. 39–43.
69. Zhu H., Zhang J., Sun H., Zhang L., Liu H., Zeng X., Yang Y., Yao Z. // *Neurosci. Lett.* 2011. V. 502. № 2. P. 71–75.
70. Bouet V., Freret T., Dutar P., Billard J.M., Boulouard M. // *Mech. Ageing Dev.* 2011. V. 132. № 5. P. 240–248.
71. Bayat M., Sharifi M.D., Haghani M., Shabani M. // *Brain Res. Bull.* 2015. V. 119(Pt A). P. 34–40.
72. Eckert M.J., Abraham W.C. // *Learn. Mem.* 2010. V. 17. № 10. P. 480–484.
73. Eckert M.J., Bilkey D.K., Abraham W.C. // *J. Neurophysiol.* 2010. V. 103. № 6. P. 3320–3329.
74. Turrigiano G.G. // *Cell.* 2008. V. 135. № 3. P. 422–435.
75. Foster T.C., Gagne J., Massicotte G. // *Brain Res.* 1996. V. 736. № 1–2. P. 243–250.
76. Artola A., Frijtag J.C., Fermont P.C.J., Gispen W.H., Schrama L.H., Kamal A., Spruijt B.M. // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 23. № 1. P. 261–272.
77. Abraham W.C., Logan B., Greenwood J.M., Dragunow M.J. // *Neurosci.* 2002. V. 22. № 21. P. 9626–9634.
78. Abraham W.C., Mason-Parker S.E., Irvine G.I., Logan B., Gill A.I. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2006. V. 86. № 1. P. 82–90.
79. Irvine G.I., Abraham W.C. // *Neurosci. Lett.* 2005. V. 391. № 1–2. P. 32–37.
80. Sharp P.E., Barnes C.A., McNaughton B.L. // *Behav. Neurosci.* 1987. V. 101. № 2. P. 170–178.
81. Feng R., Rampon C., Tang Y.P., Shrom D., Jin J., Kyin M., Sopher B., Miller M.W., Ware C.B., Martin G.M., Kim S.H., Langdon R.B., Sisodia S.S., Tsien J.Z. // *Neuron.* 2001. V. 32. № 5. P. 911–926.
82. Cortese G.P., Olin A., O’Riordan K., Hullinger R., Burger C. // *Neurobiol. Aging.* 2018. V. 63. P. 1–11.
83. Buschler A., Manahan-Vaughan D. // *Neuropharmacology.* 2017. V. 115. P. 42–50.
84. Duffy S.N., Craddock K.J., Abel T., Nguyen P.V. // *Learn. Mem.* 2001. V. 8. № 1. P. 26–34.
85. Sierra-Mercado D., Dieguez D. Jr., Barea-Rodriguez E.J. // *Hippocampus.* 2008. V. 18. № 8. P. 835–843.
86. Huang F.L., Huang K.P., Wu J., Boucheron C. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 23. P. 6230–6237.
87. Huang F.L., Huang K.P., Boucheron C. // *Learn. Mem.* 2007. V. 14. P. 512–519.
88. Bliss T.V., Collingridge G.L. // *Nature.* 1993. V. 361. P. 31–39.
89. Kiyama Y., Manabe T., Sakimura K., Kawakami F., Mori H., Mishina M. // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. P. 6704–6712.
90. Köhr G., Jensen V., Koester H.J., Mihaljevic A.L., Ut3-vik J.K., Kvellø A., Ottersen O.P., Seeburg P.H., Sprengel R., Hvalby Q. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 10791–10799.
91. Tang Y.P., Wang H., Feng R., Kyin M., Tsien J.Z. // *Neuropharmacology.* 2001. V. 41. P. 779–790.
92. Parsley S.L., Pilgram S.M., Soto F., Giese K.P., Edwards F.A. // *Learn. Mem.* 2007. V. 14. P. 75–83.
93. Bayer K.U., LeBel E., McDonald G.L., O’Leary H., Schulman H., De Koninck P. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. P. 1164–1174.
94. Vasuta C., Caunt C., James R., Samadi S., Schibuk E., Kannangara T., Titterness A.K., Christie B.R. // *Hippocampus.* 2007. V. 17. № 12. P. 1201–1208.
95. Andin J., Hallbeck M., Mohammed A.H., Marcusson J. // *Brain Res.* 2007. V. 1174. P. 18–27.
96. Naka F., Narita N., Okado N., Narita M. // *Brain Dev.* 2005. V. 27. № 4. P. 275–278.
97. Frey U., Huang Y.Y., Kandel E.R. // *Science.* 1993. V. 260. P. 1661–1664.
98. Frick K.M., Stearns N.A., Pan J.Y., Berger-Sweeney J. // *Learn. Mem.* 2003. V. 10. № 3. P. 187–198.
99. Frick K.M., Fernandez S.M. // *Neurobiol. Aging.* 2003. V. 24. № 4. P. 615–626.

100. Bennett J.C., McRae P.A., Levy L.J., Frick K.M. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2006. V. 85. № 2. P. 139–152.
101. Williams B.M., Luo Y., Ward C., Redd K., Gibson R., Kuczaj S.A., McCoy J.G. // *Physiol. Behav.* 2001. V. 73. № 4. P. 649–658.
102. Bonaccorsi J., Cintoli S., Mastrogiacomo R., Baldanzi S., Braschi C., Pizzorusso T., Cenni M.C., Berardi N. // *Neural Plast.* 2013. V. 956312.
103. Lambert T.J., Fernandez S.M., Frick K.M. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2005. V. 83. № 3. P. 206–216.
104. Nilsson M., Perfilieva E., Johansson U., Orwar O., Eriksson P.S. // *J. Neurobiol.* 1999. V. 39. № 4. P. 569–578.
105. Fuchs F., Herbeaux K., Aufreire N., Kelche C., Mathis C., Barbelivien A., Majchrzak M. // *Learn. Mem.* 2016. V. 23. № 6. P. 303–312.
106. Ballelli M., Pugliese A., Conti F. // *Exp. Gerontol.* 2021. V. 146. 111225.
107. Harati H., Majchrzak M., Cosquer B., Galani R., Kelche C., Cassel J.C., Barbelivien A. // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. № 4. P. 718–736.
108. Hullinger R., O'Riordan K., Burger C. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2015. V. 125. P. 126–134.
109. Григорьян Г.А. // *Журн. высш. нерв. деят.* 1990. Т. 40. № 4. С. 629–642.
110. Григорьян Г.А. // *Журн. высш. нерв. деят.* 2006. Т. 56. № 4. С. 556–570.
111. Levi O., Jongen-Relo A.L., Feldon J., Roses A.D., Michaelson D.M. // *Neurobiol. Dis.* 2003. V. 13. № 3. P. 273–282.
112. Jankowsky J.L., Xu G., Fromholt D., Gonzales V., Borchelt D.R. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003. V. 62. № 12. P. 1220–1227.
113. Lazarov O., Robinson J., Tang Y.P., Hairston I.S., Korade-Mirnic Z., Lee V.M., Hersh L.B., Sapolsky R.M., Mirnic K., Sisodia S.S. // *Cell.* 2005. V. 120. № 5. P. 701–713.
114. Arendash G.W., Garcia M.F., Costa D.A., Cracchiolo J.R., Wefes I.M., Potter H. // *Neuroreport.* 2004. V. 15. № 11. P. 1751–1754.
115. Adlard P.A., Perreau V.M., Pop V., Cotman C.W. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 17. P. 4217–4221.
116. Wolf S.A., Kronenberg G., Lehmann K., Blankenship A., Overall R., Staufenbiel M., Kempermann G. // *Biol. Psychiatry.* 2006. V. 60. № 12. P. 1314–1323.
117. Costa D.A., Cracchiolo J.R., Bachstetter A.D., Hughes T.F., Bales K.R., Paul S.M., Mervis R.F., Arendash G.W., Potter H. // *Neurobiol. Aging.* 2007. V. 28. № 6. P. 831–844.
118. Cracchiolo J.R., Mori T., Nazian S.J., Tan J., Potter H., Arendash G.W. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2007. V. 88. № 3. P. 277–294.
119. Stazi M., Wirths O. // *Behav. Brain Res.* 2021. V. 397. 112951.
120. Bezard E., Dovero S., Belin D., Duconger S., Jackson-Lewis V., Przedborski S., Piazza P.V., Gross C.E., Jaber M. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 35: 10999–1007.
121. Cho H., Kang K. // *Biol. Res. Nurs.* 2020. V. 22. № 4. P. 506–513.122.
122. Григорьян Г.А. // *Журн. высш. нерв. деят.* 2006. Т. 56. № 4. С. 556–570.
123. Григорьян Г.А., Гуляева Н.В. // *Журн. высш. нервн. деят.* 2015. Т. 65. № 6. С. 643–660.
124. Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В. // *Успехи физиол. наук.* 2014. Т. 44. № 2. С. 3–20.
125. Григорьян Г.А., Павлова И.В., Зайченко М.И. // *Журн. высш. нервн. деят.* 2021.

The Molecular-Cellular Mechanisms of Plastic Restructuring Produced by the Enriched Environment. The Effects on Learning and Memory

G. A. Grigoryan

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

In the current review the data about the plastic restructuring in an animal's organism under the influence of the enriched environment (EE) are considered. The EE includes 3 main components: the sensory stimulation, the social stimulation and physical activity. Each of these components does have its own peculiarities and specifics of influence, but all of them have the positive effects on the organism. In the first part of this review we consider the molecular-cellular mechanisms of the EE influence on the neurogenesis, neurotrophic factors and synaptogenesis. In the second part we provide the data of the EE effects on plastic restructuring of synaptic transmission in the hippocampal neurons, on induction and maintenance of a long-term potentiation and a long-term depression of neurons in the dentate gyrus and CA1 area of hippocampus, the neurochemical mechanisms of the EE influence and the experience of the use of transgenic animals. In the third and forth parts we consider the EE influence on learning and memory in normal animals and in animals with the disturbance of cognitive, emotional and motor functions.

Keywords: the enriched environment, hippocampus, neurogenesis, BDNF, synaptogenesis, synaptic transmission, a long-term potentiation, learning and memory

УДК 577

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПРОТЕОМИКА. НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЗГА

© 2021 г. О. А. Гомазков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.

После доработки 10.01.2021 г.

Принята к публикации 18.01.2021 г.

Протеомика — направление, которое изучает состав и изменения спектра белков в конкретных физиологических условиях. Нейропротеомика, как особая субдисциплина, разрабатывает новые подходы в изучении мозга, включая анализ количественных и качественных изменений множества белков. В статье представлен анализ данных о роли выявляемых протеомными методами белков, значимых для понимания патогенеза различных форм нейродегенеративных и психических заболеваний. Результаты протеомных исследований расширяют возможности выявления специфических биомаркеров патологии.

Ключевые слова: протеом, количественная нейропротеомика, синапс, нейродегенеративная патология, психические расстройства, биомаркеры

DOI: 10.31857/S1027813321030043

ПРЕДИСЛОВИЕ

Протеомика — новое направление, которое сочетает различные технологии, направленные на изучение огромного спектра белков в конкретных физиологических условиях. В качестве субдисциплины нейропротеомика демонстрирует возможности новых подходов изучения мозга, включая анализ количественных и качественных изменений белков различного функционального назначения. Если исходить из тезиса, что информационная функция есть главное назначение мозга, то белки нейропротеома служат материальной основой этого исполнения. Нейропротеомика позволяет по-новому понять механизмы работы мозга, а также процессы, связанные с заболеваниями, за счет выявления экспрессированных белков и изменений их взаимодействий.

Протеомная технология использует большое пространство информации о когортах белков и пептидов, их суммы, специфических изменений в исследуемом материале. Определение на основе протеомных изменений ключевых точек дисфункций важно для идентификации лекарственных мишеней и контроля эффективности применяемой терапии. Учитывая значимость и большую сложность патофизиологических и молекулярных процессов, сопровождающих заболевания мозга, использование идеологии и новых технических воз-

можностей протеомики, представляет, по сути, новое направление нейронауки.

СУЩНОСТЬ И МЕТОДЫ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Протеомика — биологическая дисциплина, которая исследует белки как главные компоненты биологической системы. Сущность протеомики заключается в количественном и качественном анализе молекул органа, ткани, компартментов клетки, биологических жидкостей и др. с целью определения роли белков в биологических процессах.

Протеомика понимается как продолжение концепции генома на основе установления роли экспрессированных белков и полипептидов. Традиционное акцентирование гена как требует конкретизации с учетом синтеза новых белков и многообразия биологических процессов. Количественный и качественный уровень “производства” белков, контролируемый определенными генами, благодаря новым методическим возможностям утверждает функциональное множество и кооперативное разнообразие белков. Таким образом, протеомика предлагает новую стратегию биолого-медицинского знания, как особый подход для точной биологии и молекулярной медицины [1].

Исследования посттрансляционных модификаций, динамики протеомов и сетевого анализа позволили расширить представления о функцио-

* Адресат для корреспонденции: 119121 Россия, Москва, Полюдиновская ул., 10/8, e-mail: oleg-gomazkov@yandex.ru.

нальной “механике” мозга. Ныне демонстрируется ключевое положение, что патогенез определяется не одним продуктом гена, а изменениями экспрессии белков и реорганизацией белковых взаимодействий. Поскольку посттрансляционные модификации представляют “продленную” генетическую информацию, суммы протеомов могут отражать определенный спектр физиологических процессов и механизмов заболеваний.

Термин *протеомика* впервые был использован в 1994 г. Марком Уилкинсом (Marc Wilkins) как продолжение “белкового эквивалента генома” [2, 3]. Появилась возможность составления карты “протеомного полотна”, которая отражает динамику процессов в рамках конкретных временных и пространственных координат [4]. Основным инструментом протеомного исследования служит масс-спектрометрия – анализ белков различных структур и спецификаций на базе усложненных методических комбинаций. Для определения выделенных белков применяют широкую панель методов, совершенствование которых соответствует сложности поставленных задач и особенностям исследуемого биоматериала. Этот подход дает возможности: (а) установления первичной структуры белков, включая посттрансляционные модификации; (б) количественного определения относительного или абсолютного содержания белков в выбранной пробе; (в) картирования белок-белковых взаимодействий на основе дополнительных данных биоинформатики [5]. Методы интегративного анализа позволяют анализировать несколько уровней кооперативных отношений белков, соответствующих их функциональной специализации:

- белки-мессенджеры, взаимодействующие с рецепторами на поверхности клеточной мембраны и участвующие в запуске сигнальных каскадов;
- белки, формирующие сетевые и структурные взаимосвязи на межклеточном уровне;
- белки как регуляторы ферментативных процессов;
- взаимодействия белков как участников аллостерических реакций в составе полимерных комплексов;
- белки, участвующие в управлении синаптическими процессами и служащие поддержке нейротрансмиссивного действия и др.

Таким образом, методология протеомных исследований позволяет представить полномерный спектр структур и функций белков как компонентов дифференциальной экспрессии.

Публикации клинических материалов сопровождаются, как правило, подробными описаниями методических и аналитических параметров, утверждающих объективность и основательность поиска. Конечным этапом многоступенчатого инструментального исследования является идентифи-

кация белка на основе информационных баз данных. Структурные особенности и функциональные характеристики белков анализируются с помощью программного приложения Ingenuity Pathway Analysis (IPA®) с использованием сетевой информации о взаимодействиях белков и их функционального назначения. База знаний UniProt (<http://www.uniprot.org/>) предоставляет сведения о структуре и биологических функциях белков, которые стали доступны в результате реализации проектов секвенирования геномов. База данных биоинформатики STRING (<http://string-db.org/>) включает сведения о более чем пяти тысячах белков, исследованных в большом объеме биологического выбора.

При анализе протеомных данных используется понятие “профилирования сигнатур” (quantitative proteomic signature profiling) в рамках сетевого контекста [6]. Качественное представление протеомной сигнатуры анализирует комбинаторику экспрессированных белков как коэффициенты совпадений в сетевых молекулярных комплексах. Этот подход используется для анализа данных исследований как аутопсийного, так прижизненного (кровь, цереброспинальная жидкость) клинического материала.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПРОТЕОМИКА КАК НОВЫЙ ПОДХОД В ИССЛЕДОВАНИИ МОЗГА

Традиционная нейрохимия мозга, которая в течение многих десятилетий исповедовала принцип последовательного анализа отдельных молекулярных продуктов (нейромедиаторы, нейропептиды, нейротрофические и ростовые факторы, аминокислоты и др.) получила на основе интегративной количественной нейропротеомики новые мотивации для объемного понимания патологического процессов. Функциональная протеомика дает представление о роли белков и их комплексов, взаимосвязей, регуляторных и метаболических цепей. Предлагаемое как новое направление нейропротеомика включает пространственные, регуляторные и временные аспекты исследования мозга [7–9]. Оценка количества публикаций, представляемых базой данных PubMed, показывает, что в интервале 1990–2020 гг. по запросу “Proteomics” выявлено около 135 тысяч статей в рейтинговых журналах. Из этого количества запросу “Proteomics + brain” соответствует 8500 статей. Возрастающая кривая по годам демонстрирует максимум в 2016–2020 гг.

Протеомные исследования мозга, охватывая множества структур нейрональных клеток, послужили составлению белковых карт головного мозга и его сигнальной молекулярной организации [10]. Можно согласиться, что протеомный анализ регионов мозга и клеточных компартмен-

тов при изменениях функциональных состояний, включая этапы патогенеза и результаты терапевтического воздействия, представляет новый подход [11, 12]. Эта стратегия адресуется с учетом изменений уровня экспрессированных белков, причастных к патогенезу, оценке белкового спектра как причины дисфункции, идентификации клинических биомаркеров. Ключевые для патогенеза белки, или группы сопряженных белков, получаемые из сыворотки крови, цереброспинальной жидкости или постмортальных образцов, служат объектами анализа новой категории.

Значительным затруднением в проведении протеомных исследований оказывается морфологическая специфичность клеток и тканей мозга. Архитектура мозга млекопитающих содержит нескольких сотен типов клеток с особыми характеристиками [13]. Присутствие различных клеточных популяций, регулируемых множеством белковых и других молекулярных компонентов, обеспечивает необходимое разнообразие процессов, обозначаемых как функциональная пластичность мозга.

Особенные с учетом клеточного типа протеомные исследования определили возможности нового подхода в изучении механизмов работы здорового и “больного” мозга. Современные технологии масс-спектрометрии позволяют проводить высокоточные количественные определения целых тканевых массивов или небольших белковых компартментов с использованием лазерной микродиссекции нейронов. Такая биохимическая микрохирургия позволяет непосредственно анализировать белки, получаемые из срезов мозга. При обработке ультрафиолетовым лучом и фиксации инфракрасным лазером отбираются группы клеток или даже одиночные нейроны [14]. Для анализа протеома разработаны способы субклеточного профилирования белков и селективной маркировки органелл ядерных и митохондриальных структур [15, 16].

Нейропротеомика позволяет концентрировать интерес на новых целевых конструкциях. В сочетании с достижениями геномики и биоинформатики протеомика рассматривается как вероятный подход в ранней диагностике нейродегенеративных и психических заболеваний [17]. Образно выражаясь, “молекулярная дактилоскопия”, благодаря идентификации белковых профилей, позволяет разделять связанные фенотипы заболевания [18].

На основании анализа, предлагаемого в обзоре [9], можно суммировать несколько положений, определяющих возможности современной нейропротеомики.

- Количественные методы масс-спектрометрии открыли способы сравнительного применения количественной протеомики ко многим областям нейробиологии: процессов развития, синаптиче-

ской пластичности, трансформации стволовых клеток, заболеваний головного мозга.

- Нейропротеомика характеризует пространственную структуру комплексов белков в нервной системе: в структуре нейрона, синапса, белковых взаимодействий при образовании функциональных сетей. Становится возможным понимание постгеномной трансформации белков и образования молекул “нужного функционального назначения”, составляющих объемную картину мозга.

- Нейропротеомика предоставляет данные о молекулярной организации мозга на разных уровнях его функционирования — от белковых комплексов синаптической организации до анализа различных типов заболеваний мозга: предтечи, динамики, прогноза, терапевтической эффективности.

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ. ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИИ

Протеомные исследования предоставляют новые возможности для конкретизации молекулярных процессов, определяющих патогенез нейродегенеративных и психических заболеваний. Важную информацию содержат данные о когортах белков, относящихся к контролю основных (базовых) биохимических функциях. Исследования на аутопсийном материале и трансгенных моделях болезни Альцгеймера (БА) подтверждают, что окислительное повреждение приводит к изменениям экспрессии когорт митохондриальных ферментов. Дисфункция этих комплексов протеома рассматривается как ведущая причина инициации патогенеза [19].

Одним из отличительных признаков БА и других нейродегенеративных заболеваний является накопление убиквитиновых белковых агрегатов. Отмечается, что многие из модифицированных изопептидов (протеоформ) тау-белка влияют на связывание микротрубочек и агрегацию тау-белка, компонента формирования нейрофибриллярных клубков [20].

В обзорной публикации Li K. et al. [21] представлен анализ изменений протеома, выявляемых в аутопсийном материале БА, болезни Паркинсона (БП) и бокового амиотрофического склероза (БАС). Суммированы основные группы фактов.

1. Кластерный анализ сгруппировал белки со сходными паттернами экспрессии на ранней стадии БА, которые показали этапы изменения уровня экспрессированных белков, соответствующие стадиям и форме заболевания. Установлено также, что группа с повышенной экспрессией была представлена преимущественно белками астроцитарных генов. Эта информация согласуется с выраженным прогрессированием астроглиоза при нейродегенеративной патологии.

2. Представлены материалы изменений протеомов при бессимптомной и симптоматической БА. В качестве общего признака было установлено, что белки, участвующие в различных биологических процессах, могут совместно регулироваться на разных стадиях заболевания. Несколько модулей экспрессии белков показали их значительное снижение. При асимптоматической форме БА выявлялась экспрессия протеомных модулей, ассоциируемых с воспалительной реакцией, активацией астроцитов и пролиферацией микроглии. Изменения функциональных групп при БА указывают на увеличение белковых сетей, связанных с глияльными клетками и снижением уровня нейронных белков, что приводит к ухудшению когнитивных функций и памяти.

3. Отмечаются вариации регион-специфической экспрессии белков при БА. Выбранные области были сгруппированы как сильно пораженные (гиппокамп, энторинальная кора и поясная извилина), слабо пораженные (сенсорная кора и моторная кора) и наименее пораженные (мозжечок).

Конечная цель этих работ, использующих новые технологии биохимического анализа, служит уточнению молекулярных механизмов различных форм нейродегенеративной патологии мозга и обозначению групп белков или отдельных молекул в качестве полезных маркеров.

Детализацию очерченных признаков иллюстрируют данные других статей. Рассматривается несколько причин, определяющих разнообразие биохимических механизмов, которые ведут к гибели нейронов. Митохондриальная дисфункция занимает центральное место в инициации нейродегенеративных заболеваний, включая БА. Количественный протеомный подход с использованием изобарической метки (iTRAQ) выявил изменения, связанные с белками митохондрий, которые отличали фенотип БА от процессов возрастного старения. Белковые субъединицы транспортной цепи электронов указывали на большие нарушения структуры митохондрий при БА [22].

В материале гиппокампа сравнение групп экспрессированных белков позволило дифференцировать формы и стадии БА. На ранней стадии экспрессия групп белков характеризовала изменения уровня внеклеточного матрикса и Ca^{2+} -зависимых сигнальных белков. Первичные изменения были связаны с цитоскелетом и синаптическими компонентами, такими как RIMS1 и GRIK4 [23]. У лиц со спорадической формой БА были конкретизированы белки с повышенной или с пониженной экспрессией, которые можно было рассматривать как маркеры амилоидных поражений лобной коры [24].

В материале доклинической стадии БА описаны изменения в белковых сетях, в которых большая часть белков мембраносвязанного контента де-

монстрировали корреляцию с клиническими фенотипами. Число экспрессированных белков внеклеточного матрикса (CSPG, ACAN и PTN) было заметно увеличено, тогда как белки, ассоциируемые с синаптической функцией и синаптогенезом (SYNPO1, VGF, CAMKK2, CAMK4) показывали снижение экспрессии [25]. Ху и соавт. [26] на клиническом материале БА обосновали положение о региональной экспрессии протеомов, коррелирующих с тяжестью поражения. Изменения белков связываются с механизмом апоптоза и деструкцией нейронов [26]. На основании результатов протеомного анализа составлено объемное картирование экспрессии белков при боковом амиотрофическом склерозе и фронтотемпоральной деменции [27].

Особое место в анализе причин нейродегенеративной патологии занимают исследования протеомов синаптических белков. Белковые панели, демонстрируя различия в группах нейродегенеративных заболеваний, подтверждают связь между когнитивными нарушениями, развитием деменции и потерей синаптических белков. Аутопсийные исследования мозга при БА, БП и патологии с тельцами Леви показали, что изменения экспрессии белков синаптических везикул VAMP2, Syntaxin-1, SNAP, Munc18, постсинаптических белков NRG1, PSD95, LRFN2 и рецепторных белков (GRIA 3–4) оказываются ассоциированными с этим заболеванием [28–30]. Анализ белков цереброспинальной жидкости у пациентов с деменцией Альцгеймеровского типа также установил изменения синаптических белков Calsyn-tenin-1, GluR4, Neurexin-2A/3A и др., сниженный уровень которых предшествовал клиническим симптомам [32].

ПСИХИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА. ПРОТЕОМНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Современные представления об этиологии психических расстройств исходят из того, что заболевания могут быть результатом генетической предрасположенности и влияния факторов окружающей среды. В понимании сложной картины заболевания следует учитывать роль посттрансляционных модификаций белков, которые определяют большой спектр функций мозга.

Протеомные исследования расширили представление о молекулярных механизмах, причастных к патогенезу психического расстройства. Методы масс-спектрометрии и двухмерный гель-электрофорез выявили значение цитоскелетных, антиоксидантных и митохондриальных белковых сетей в сложной картине патогенеза. Исследования карт иммунных профилей обнаруживали на первых этапах заболевания изменения гормонов, факторов роста и белков, связанных с оксидативным стрессом, апоптозом и цитовоспалением. Мето-

дология протеомного исследования используется также для оценки вероятных маркеров нейропсихических расстройств. Следует согласиться, однако, что эти достижения еще относительно далеки от их клинических интерпретаций [33, 34].

Протеомные исследования материала мозга и биологических жидкостей позволили получить новые сведения о больных шизофренией (ШЗФ), биполярными расстройствами (БР) и большим депрессивным расстройством (БДР). Сравнение протеомов в гиппокампе больных ШЗФ и БР представили измененные уровни белков митохондриальной функции и эндоцитоза [35].

Отдельное внимание уделено группам особых белков, которые, по-видимому, служат регуляторами патофизиологических реакций. К ним относятся определяемые как биомаркеры в цереброспинальной жидкости глиальный фактор-бета (GMF-β), нейротрофический фактор мозга (BDNF) и изоформы 115 кДа каталитической субъединицы Rab3-GTP-активирующего белка (RAB3GAP1). Для пациентов с ШЗФ снижение уровня этих показателей ассоциируется с нейропсихическими расстройствами [36, 37].

Наличие биохимических изменений в мозге, связанных с энергетическими процессами, традиционно связывается с клиническими особенностями психических расстройств ШЗФ, БР, БДР. В публикации группы Zuccoli и соавт. [38] проанализированы когорты белков, непосредственно характеризующие уровни метаболических процессов в мозге. В сумме протеомов, имеющих отношение к функции митохондрий, продукции АТФ, Ca²⁺-гомеостаза и липидного обмена устанавливается связь с контролем общего пула энергетического метаболизма. В качестве отдельных примеров протеомного анализа отмечается, что общая дифференциальная экспрессия ферментов типа цитратсинтазы подавляется при ШЗФ, но активируется при БР и БДР, тогда как малатдегидрогеназа подавляется при БР и усиливается при ШЗФ и БДР. Исследования мозга пациентов с акцентом на энергетический метаболизм позволяет установить сходства молекулярных (протеомных) девиаций между этими заболеваниями, но также выделить особенные черты для каждого расстройства.

Нарушения нейротрансмиттерной функции. Традиционный клинический анализ рассматривает в качестве первого уровня психического расстройства дисфункции нейротрансмиттерных процессов. Выявляемые с помощью новой методологии изменения когорт синаптических белков оказываются характерными для ШЗФ и БР [39]. Протеомный анализ с использованием изобарических меток (iTRAQ) выявил в ликворе пациентов БДР различия в группах белков, связанных с синаптической передачей. Представлен перечень измененных когорт синаптических белков при БДР

как начальной причины расстройства [40]. Протеомные и геномные исследования демонстрируют изменения экспрессии белков постсинаптической плотности, одной из важнейших регуляторных зон нейротрансмиссии [41, 42]. В гиппокампе отмечены изменения у больных ШЗФ и БР белков группы 14-3-3, контролирующей ГАМК-ергическую нейротрансмиссию [43].

В общем плане, речь идет об идентификации когорт синаптических белков нейротрансмиттерного назначения. Разнообразие организации белковых модулей, участие больших групп молекул в контроле нейрональной пластичности свидетельствуют о регуляторном потенциале мозга. С тех же позиций становится понятным сложность различных форм нейродегенеративных и психических расстройств, когда нарушенный порядок молекулярных процессов рассматривается как причинный механизм патогенеза [44].

БИОМАРКЕРЫ КАК СТРАТЕГИЧЕСКАЯ ЗАДАЧА ПРОТЕОМИКИ

Выявление биомаркеров — ключевых белков патогенеза и мишенной терапии — оказывается доминирующей темой многих протеомных исследований. Белки, определяемые в цереброспинальной жидкости, в крови или аутопсийном материале, позиционируются как объекты диагностики, прогнозирования и мониторинга терапии. Стратегическая линия применения нового направления — протеомики — становится все более информативно обоснованной. При анализе нейродегенеративных заболеваний были установлены группы белков, позволяющие разделять клинические формы или стадии заболевания [45, 46]. Нынешний уровень протеомного анализа выявляет биомаркеры БА и форм амилоидной патологии [47].

У психиатрических пациентов комплексные протеомные исследования цереброспинальной жидкости включали использование, помимо таргетной масс-спектрометрии, мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring). Этот подход позволил продемонстрировать возможности дифференциального анализа биомаркеров в панели психических расстройств, включавших БДР, ШЗФ и БР. Среди значимых комплексов выделяются сигнатуры пониженных уровней комплексов синаптических белков [48]. Часть этих особых белков принадлежит к семейству нейрексинов, которые представляют собой молекулы адгезии синаптических клеток, значимых для регулирования передачи сигналов [49].

Существенным оказывается применение нейропротеомики для контроля эффективности конкретных терапевтических препаратов. В экспериментальных исследованиях синаптическая коррек-

ция антидепрессантами подтверждена данными протеомного анализа [50].

Следует, однако, заметить, что несмотря на явный оптимизм в теме биомаркеров и представлении новых кандидатов, среди критических резонансов отмечается, что материалы прижизненных протеомных исследований (кровь, ликвор) содержат “квази-маркерные” белки, где шумовой фон других молекул затемняет картину анализа [51]. И хотя для минимизации этих затруднений используются дополнительные технологии, широкий профиль протеомного материала в тканях мозга или биологических жидкостях, вызывает еще затруднения в идентификации биомаркеров [52, 53].

В качестве особой позиции следует, однако, констатировать, что поиск биомаркеров, типичных только для конкретной формы психического или иного типа заболевания, является неточно сформулированной задачей. Вероятно, выявление ключевых молекул патогенеза следует сосредоточить на интеграции комплексной панели белков данного расстройства [54]. Представляется вероятным, что комбинированный анализ нескольких биомаркеров определит специфическую для пациента сигнатуру диагностики нейродегенеративных и психических заболеваний.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А.И. // Вопросы мед. химии. 2000. Т. 46. № 4. С. 335–343.
2. Wilkins M. // Expert Review of Proteomics. 2009. V. 6. № 6. P. 599–603.
3. Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A. et al. // Electrophoresis. 1995. V. 7. P. 1090–1094.
4. Lamond A.I., Uhlen M., Horning S., Makarov A., Robinson C.V., Serrano L., Hartl F.U., Baumeister W., Wernskiold A.K., Andersen J.S., Vorm O., Linial M., Aebersold R., Mann M. // Mol. Cell. Proteomics. 2012. V. 11. № 3. P. O112.017731.11.
5. Новикова С.Е., Згода В.Г. // Биомед. химия. 2015. Т. 61. № 5. С. 529–544.
6. Goh W.W.B., Guo T., Aebersold R., Wong L. // Biol. Direct. 2015. V. 10. P. 71. <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0098-x>
7. Bayes A., Grant S.G. // Nat. Rev. Neurosci. 2009. V. 10. № 9. P. 635–646.
8. Becker M., Schindler J., Nothwang H.G. // Electrophoresis. 2006. V. 27. № 13. P. 2819–2829.
9. Williams K.R., Nairn A.C. // Proteomes. 2019. V. 7. № 2. P. 24–28.
10. Hosp F., Mann M.A. // Neuron. 2017. V. 96. № 3. P. 558–571.
11. Craft G.E., Chen A., Nairn A.C. // Methods. 2013. V. 61. № 3. P. 186–218.
12. Гомазков О.А. // Успехи современ. биологии. 2020. Т. 140. № 4. С. 347–358.
13. Wilson R.S., Nairn A.C. // Proteomes. 2018. V. 6. № 4. pii: E51. <https://doi.org/10.3390/proteomes6040051>
14. Curran S., McKay J.A., McLeod H., L. Murray G.I. // Mol. Pathol. 2000. V. 53. P. 64–68.
15. Drissi R., Dubois M.L., Boisvert F.M. // FEBS J. 2013. V. 280. № 22. P. 5626–5634.
16. Zhu H., Tamura T., Hamachi I. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2019. V. 48. P. 1–7.
17. Сучков С.В., Гнатенко Д.А., Костюшев Д.С., Крынский С.А., М.А. Пальцев М.А. // Вестник РАМН. 2013. Т. 6. № 1. С. 65–71.
18. Comes A.L., Papiol S., Mueller T., Geyer P.E., Mann M., Schulze T.G. // Transl. Psychiatry. 2018. V. 8(1). P. 160.
19. Moya-Alvarado G., Gershoni-Emek N., Perlson E., Bronfman F.C. // Mol. Cell. Proteomics. 2016. V. 15. № 2. P. 409–425.
20. Seyfried N.T., Dammer E.B., Swarup V., Nandakumar D., Duong D.M., Yin L., Deng Q., Nguyen T., Hales Ch.M., Wingo T., Glass J., Gearing M., Thambisetty M., Troncoso J., Geschwind D., Lah J.J., Levey A.I. // Cell Syst. 2017. V. 4. № 1. P. 60–72.
21. Li K.W., Ganz A.B., Smit A.B. // J. Neurochem. 2019. V. 151. № 4. P. 435–445.
22. Adav S.S., Park J.E., Sze S.K. // Mol. Brain. 2019. V. 12. № 1. P. 8. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0430-y>
23. Hondius D.C., van Nierop P., Li K.W. Hoozemans J.M., van der Schors R.C., van Haastert E.S., van der Vies S.M., Rozemuller A.J.M., Smit A.B. // Alzheimers Dement. 2016. V. 12. № 6. P. 654–668.
24. Zhang O., Ma Ch., Gearing M., Wang P.G., Chin L-Sh., Li L. // Acta Neuropathol. Commun. 2018. V. 6. № 1. P. 19. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0524-2>
25. Higginbotham L., Dammer E.B., Duong D.M., Modeste E., Montine T.J., Lah J.J., Levey A.I., Seyfried N.T. // Proteomes. 2019. V. 7. № 3. pii: E30. <https://doi.org/10.3390/proteomes7030030>
26. Xu J., Patassini S., Rustogi N., Riba-Garcia I., Hale B.D., Phillips A.M., Waldvogel H., Haines R., Bradbury Ph., Stevens A., Faull R.L.M., Dowsey A.W., Cooper G.J.S., Unwin R.D. // Commun. Biol. 2019. V. 2. P. 43. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0254-9>
27. Iridoy M.O., Zubiri I., Zelaya M.V., Martinez L., Ausin K., Lachen-Montes M., Santamaria E., Fernandez-Irigoyen J., Jericó I. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 20. № 1. P. 4. doi : 30577465. <https://doi.org/10.3390/ijms20010004>. PMID
28. Reddy P.H., Mani G., Park B.S., Jacques J., Murdoch G., Whetsell W.Jr., Kaye J., Manczak M.J. // Alzheimers Dis. 2005. V. 7. № 2. P. 103–117.
29. Masliah E., Mallory M., Alford M., DeTeresa R., Hansen L.L., McKeel Jr D.W., Morris J.C. // Neurology. 2001. V. 56. № 1. P. 127–129.

30. Rockenstein E., Nuber S., Overk C.R., Ubhi K., Mante M., Patrick Ch., Adame A., Trejo-Morales M., Gerez J., Picotti P., Jensen P.H., Campioni S., Riek R., Winkler J., Gage F.H., Winner B., Masliah E. // *Brain*. 2014. V. 137. № 5. P. 1496–1513.
31. Bereczki E., Francis P.T., Howlett D., Pereira J.B., Höglund K., Bogstedt A., Cedazo-Minguez A., Baek J.-H., Hortobágyi T., Attems J., Ballard C., Aarsland D. // *Alzheimers Dement*. 2016. V. 12. P. 1149–1158.
32. Lleo A., Nunez-Llaves R., Alcolea D., Chiva C., Balateu-Paños D., Colom-Cadena M., Gomez-Giro G., Muñoz L., Querol-Vilaseca M., Pegueroles J., Rami L., Lladó A., Molinuevo J., Tainta M., Clarimón J., Spires-Jones T., Blesa R., Fortea J., Martínez-Lage P., Sánchez-Valle R., Sabido E., Bayés A., Belbin O. // *Mol. Cell Proteomics*. 2019. V. 18. № 3. P. 546–560.
33. Wesseling H., Guest P.C., Lago S.G., Bahn S. // *Int. J. Neuropsychopharm*. 2014. V. 17. № 8. P. 1327–1341.
34. Wesseling H., Gottschalk M.G., Bahn S. // *Int. J. Neuropsychopharm*. 2015. V. 18. № 1. P. 15. doi.org/https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu015
35. Saia-Cereda V.M., Cassoli J.S., Martins-de-Souza D., Nascimento J.M. // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci*. 2017. V. 267. № 1. P. 3–17.
36. Rodrigues-Amorim D., Rivera-Baltanás T., Vallejo-Curto M., Rodriguez-Jamardo C., de Las Heras E., Barreiro-Villar C., Blanco-Formoso M., Fernández-Palleiro P., Álvarez-Ariza M., López M., García-Caballero A., Olivares J.M., Spuch C. // *Front Psychiatry*. 2019. V. 10. P. 885. https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00885
37. Zhang Y., Fang X., Fan W., Tang W., Cai J., Song L., Zhang Ch. // *Psychopharmacology (Berl)*. 2018. V. 235(4). P. 1191–1198.
38. Zuccoli G.S., Saia-Cereda V.M., Nascimento J.M., Martins-de-Souza D. // *Front Neurosci*. 2017. V. 11. P. 493. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00493
39. Pennington K., Beasley C.L., Dicker P., Fagan A., English J., Pariente C.M., Wait R., Dunn M.J., Cotter D.R. // *Mol. Psychiatry*. 2008. V. 13(12). P. 1102–1117.
40. Al Shweiki M.R., Oeckl P., Steinacker P., Barschke P., Dorner-Ciossek C., Hengerer B., Schönfeldt-Lecuona C., Otto M. // *Transl. Psychiatry*. 2020. V. 10. № 1. P. 144. https://doi.org/10.1038/s41398-020-0825-7
41. Focking M., Dicker P., Lopez L.M., Hryniewiecka M., Wynne K., English J.A., Cagney G., Cotter D.R. // *Transl. Psychiatry*. 2016. V. 6. № 11:e959. https://doi.org/10.1038/tp.2016.224
42. Focking M., Lopez L.M., English J.A., Dicker P., Wolff A., Brindley E., Wynne K., Cagney G., Cotter D.R. // *Mol. Psychiatry*. 2015. V. 20. P. 424–432.
43. Schubert K.O., Föcking M., Cotter D.R. // *Schizophr. Research*. 2015. V. 167. № 1–3. P. 64–72.
44. Гомазков О.А. // *Нейрохимия*. 2015. Т. 32. № 3. С. 192–205.
45. Bateman R.J., Xiong C., Benzinger T.L., Fagan A.M., Goate A. et al. // *N. Engl. J. Med*. 2012. V. 367. P. 795–804.
46. Jack C.R., Knopman D.S., Jagust W.J., Shaw L.M., Aisen P.S., Weiner M.W., Petersen R.C., Trojanowski J.Q. // *Lancet Neurol*. 2010. V. 9. P. 119–128.
47. Westwood S., Baird A.L., Anand S.N. et al. // *J. Alzheimers Dis*. 2020. V. 74. № 1. P. 213–225.
48. Al Shweiki M.R., Oeckl P., Steinacker P., Barschke P., Dorner-Ciossek C., Hengerer B., Schönfeldt-Lecuona C., Otto M. // *Transl Psychiatry*. 2020. V. 10. № 1. P. 144. https://doi.org/10.1038/s41398-020-0825-7
49. Südhof T.C. // *Cell*. 2017. V. 171. № 4. P. 745–769. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.024
50. Guest P.C. // *Methods Mol. Biol*. 2020. V. 2138. P. 419–430.
51. Spector R., Snodgrass S.R., Johanson C.E. // *Exp. Neurol*. 2015. V. 273. P. 57–68.
52. Schwenkenbecher P., Janssen T., Wurster U., Konen F.F., Neyazi A., Ahlbrecht J., Puppe W., Bönig L., Sühs K.-W., Stangel M., Ganzenmueller T., Skripuletz T. // *Front Neurol*. 2019. V. 10. P. 584. https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00584
53. Barkovits K., Kruse N., Linden A., Tönges L., Pfeiffer K., Mollenhauer B., Marcus K. // *Cells*. 2020. V. 9. № 2. P. 370. https://doi.org/10.3390/cells9020370
54. Smirnova L., Seregin A., Boksha Ir., Dmitrieva E., Simutkin G., Kornetova E., Savushkina O., Letova A., Bokha N., Ivanova S., Zgoda V. // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. № 7. P. 535. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5848-1

Functional Proteomics. New Approaches in Researching Brain Diseases

O. A. Gomazkov

Orekhovich Scientific Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Proteomics is a direction that combines technologies for studying the spectrum of proteins in specific physiological conditions. Neuroproteomics, as a special discipline, develops new approaches to studying the brain, including the analysis of quantitative and qualitative changes in many proteins. The article presents an analysis of data on the role of proteins detected by proteomic methods, which are important for understanding the pathogenesis of various forms of neurodegenerative and mental diseases. During proteomic analysis, groups of differentially expressed proteins were identified, allowing the identification of clinical forms or stages of the disease. Proteomic research data expand the possibilities of biomarker detection as a new therapeutic approach.

Keywords: proteome, quantitative neuroproteomics, synapse, neurodegenerative pathology, mental disorders, biomarkers

УДК 57.053+612

НЕЙРОСТЕРОИДЫ И ДЕПРЕССИВНЫЕ СОСТОЯНИЯ

© 2021 г. Д. А. Жуков^{1, *}, Е. П. Виноградова²

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

²Биологический факультет СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 25.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 16.04.2021 г.

Нейростероидами называют стероиды, которые способны быстро менять возбудимость нейронов, взаимодействуя с мембранными рецепторами, преимущественно с ГАМК/А рецепторным комплексом. Нейростероиды синтезируются как в ЦНС, так и в периферических тканях, из которых попадают в мозг с системным кровотоком. Нейростероиды участвуют в регуляции эмоций и поэтому могут быть важны для формирования депрессивных состояний. Изучение нейростероидов открывает возможности новых подходов к лечению депрессивных состояний.

Ключевые слова: нейростероиды, депрессия

DOI: 10.31857/S1027813321030158

Механизмы формирования депрессивных расстройств, в первую очередь большой депрессии и посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР) далеки от полного понимания исследователями. Моноаминовая теория этиологии этих расстройств, увязывающая патологию с дефицитом норадреналин-, дофамин- и серотонинергических систем ЦНС, подтверждается лишь частично. К лекарственной терапии оказывается чувствительны лишь 30–50% больных [1], поэтому внимание исследователей проблемы депрессий привлекают и другие механизмы в ЦНС, в частности, нейростероиды (НС).

Стероидные гормоны синтезируются не только в периферических железах — коре надпочечников, гонадах и плаценте — но и в ЦНС. Впервые это было показано группой Э.Э. Болле в начале 1980-х годов [2, 3]. Оказалось, что НС взаимодействуют с рецепторами ГАМК типа А (ГАМК/А-рц) [4, 5], модулируя их активность подобно барбитуратам [6, 7] и бензодиазепинам [8] и проявляя анксиолитическое, седативное и противосудорожное действие [9]. Таким образом было показано, что седативный эффект системного введения

прогестерона, описанный Гансом Селье еще в 1941 г. [10, 11] имеет центральный механизм.

Открытие взаимодействия НС с ГАМК/А-рц было существенным шагом в физиологии, поскольку до этого считалось, что стероиды свободно проникают в клетку и взаимодействуют с рецепторами в цитозоле, перемещаясь затем в ядро, где модулируют процесс трансляции. Такие “классические” эффекты стероидов проявляются полностью только через несколько часов после взаимодействия стероида с клетками-мишенями, а при взаимодействии с рецепторами, расположенными в клеточной мембране, гормоны могут проявлять свои эффекты спустя секунды.

БИОСИНТЕЗ НЕЙРОСТЕРОИДОВ

Основными НС млекопитающих являются следующие: прегнанолаон, аллопрегнанолаон (ALLO), прегненолаон, дегидроэпиандростерон (DHEA), тетрагидродезоксикортикостерон (THDOC), андростерон, андростандиол (рис. 1).

Разумеется, в ЦНС могут свободно проникать и те стероиды, которые синтезируются в периферических эндокринных железах и подвергаются дальнейшему метаболизму в печени и коже — органах с высокой активностью обоих восстановительных ферментов синтеза НС [12]. Поэтому к НС можно отнести не только те стероиды, которые синтезируются в ЦНС. С определенными оговорками можно относить к НС и прогестерон, и эстродиол, поскольку обнаружены места связывания этих “классических” стероидных гормонов с кле-

Принятые сокращения: АКТГ — адренокортикотропин; ГАМК/А-рц — рецептор ГАМК типа А; ГАС — гипоталамо-адренальная система; КРГ — кортикотропин-рилизинг гормон; НС — нейростероиды; ПМДР — предменструальное дисфорическое расстройство; ПМС — предменструальный синдром; ПТСР — посттравматическое стрессорное расстройство; ALLO — аллопрегнанолаон; DHEA — дегидроэпиандростерон; THDOC — тетрагидродезоксикортикостерон.

* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, e-mail: dazhukov0@gmail.com.

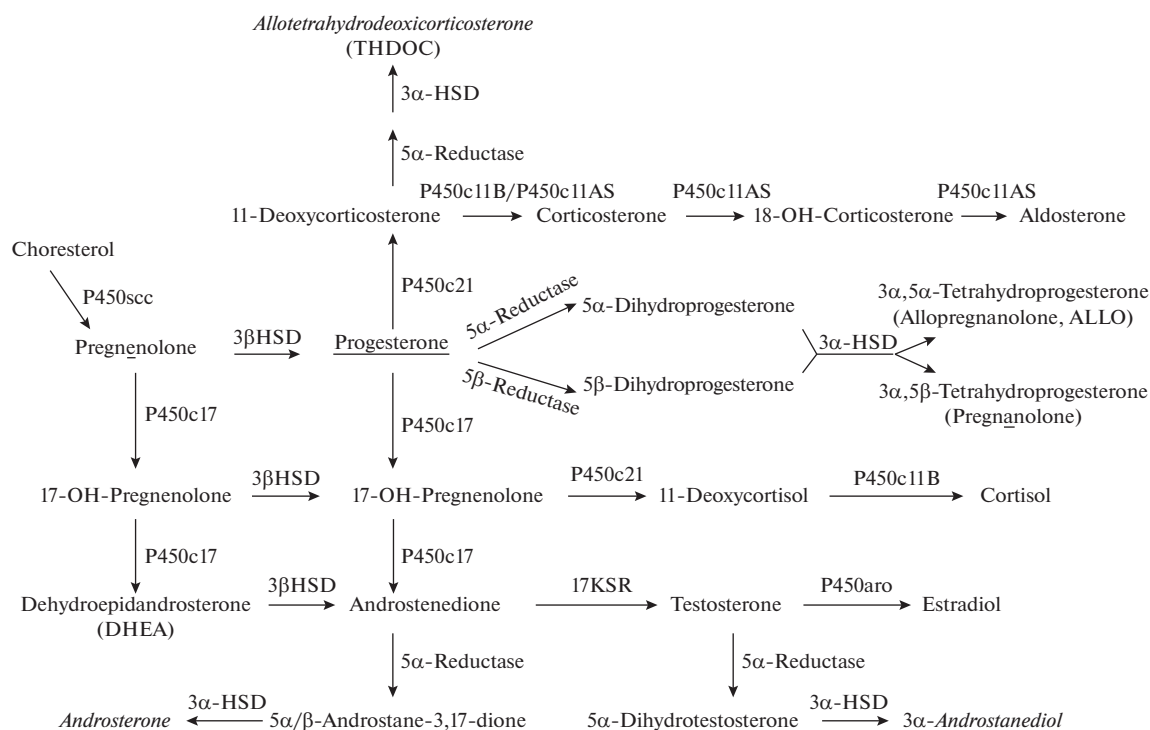


Рис. 1. Схема биосинтеза нейростероидов (по [71]). 3α-HSD — 3α-гидроксистероид дегидрогеназа, 5α-Reductase — 5α-редуктаза, 17KSR — 17-кетостероид редуктаза, P450 — цитохромы.

точными мембранами [13–16]. Некоторые авторы называют “НС” только синтезируемые в ЦНС стероиды, а для обозначения всех мембранотропных стероидов независимо от места их синтеза используют термин “нейроактивные стероиды” [17–19]. Но в данном обзоре мы будем использовать традиционный термин “НС” в широком смысле.

Повторим, что главная особенность НС — взаимодействие с рецепторами, расположенными на клеточных мембранах, в том числе и синаптических, что обеспечивает негеномные эффекты этих гормонов, в частности, модуляцию синаптической передачи.

Места синтеза НС в ЦНС многочисленны. У грызунов и у человека это нейроны и глиальные клетки коры больших полушарий, гиппокампа, обонятельной луковицы, миндалины и таламуса, а также клетки Пуркинье мозжечка. В этих структурах локализованы ключевые ферменты биосинтеза большинства НС: 5α-редуктаза и 3α-гидроксистероид дегидрогеназа [20–26] (рис. 1). Поскольку активность 3α-гидроксистероид дегидрогеназы много выше активности 5α-редуктазы, этот последний фермент определяет скорость синтеза НС [9]. Помимо упомянутых двух ферментов, в астроцитах и нейронах экспрессируется и цитохром расщепления боковой цепи холестерина (P450scc), превращающий холестерин в прегненолон, необходимый для синтеза всех НС [27].

Биосинтез НС контролируется белком-транслокатом (18 kDa), который раньше называли периферическим или митохондриальным бензодиазепиновым рецептором [28, 29]. Этот белок-транслокатор широко представлен в периферических тканях и в головном мозге. Он в основном расположен во внешней митохондриальной мембране и переносит холестерин во внутреннюю мембрану митохондрий [30]. Активация этого белка определенными лигандами облегчает поступление холестерина внутрь митохондрий и тем самым повышает доступность холестерина для P450scc, фермента, расположенного во внутренней митохондриальной мембране. Селективные лиганды этого белка-транслокатора могут стимулировать биосинтез НС в головном мозге [31, 32], подтверждая важную роль белка-транслокатора в нейростероидогенезе.

Молекулы НС могут подвергаться сульфатированию. Присоединение сульфат-иона меняет фармакодинамические свойства НС [33]. Так прегнанолон — это один из модуляторов ГАМК/A-рц, тогда как прегнанолон-сульфат — модулятор НМДА рецепторов [34–37].

ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ НЕЙРОСТЕРОИДОВ

НС связаны с процессами нейрогенеза, миелинизации, нейропротекции и синаптической пла-

стичности и, соответственно, с функциями обработки информации, обучения и памяти [38–43]. НС участвуют в формировании ряда поведенческих, психических и неврологических расстройств, таких как шизофрения [44, 45], эпилепсия [46, 47], нарушения памяти, в том числе и при болезни Альцгеймера [48]. Помимо ГАМК/А-рц НС взаимодействуют с НМДА и АМПА рецепторами глутаматергической системы [34, 49, 50], но основное внимание к НС обусловлено их способностью взаимодействовать с ГАМК/А-рц и участвовать тем самым в регуляции эмоций, вовлекаясь таким образом в формирование тревожных и депрессивных состояний.

Основная причина депрессивных расстройств — стресс. НС участвуют в стрессорной реакции, в частности в регуляции активности гипофиз-адреналовой системы (ГАС). У крыс и мышей уровни ALLO и THDOC возрастают во время острого стресса [51–53] как в крови, так и в мозге [52]. У человека уровень ALLO увеличивается после введения кортикотропин-рилизинг гормона (КРГ) или АКТГ [54], а также во время стресса в эксперименте, или же после стрессового жизненного события [55, 56]. На животных моделях показано, что хронический стресс приводит к уменьшению концентрации ALLO в крови [57], а введение ALLO восстанавливает нормальное функционирование ГАС [58]. Предварительное введение крысам прогестерона, ALLO и THDOC уменьшает вызванный стрессом подъем АКТГ и кортикостерона в крови [59, 60]. Введение ALLO снижает экспрессию мРНК КРГ в паравентрикулярном ядре гипоталамуса и ослабляет проявления тревоги в поведении, вызванные введением КРГ [61]. Соответственно, иммунонейтрализация ALLO увеличивает вызванный стрессом подъем кортикостерона в крови [62]. В то же время введение THDOC в паравентрикулярное ядро увеличивает стрессорный ответ [63]. На животных моделях большой депрессии и ПТСР показан сниженный уровень ALLO в миндалине, гиппокампе и медиальной префронтальной коре [64–67], структурах, связанных, как известно, с формированием эмоций.

Эти и подобные результаты свидетельствуют об участии НС в регуляции стрессорной активности ГАС как на уровне гипоталамуса, так и на уровне экстрагипоталамических структур, участвующих в организации как эндокринного, так и эмоционального компонента стрессорной реакции и, как следствие, в формировании депрессивных состояний.

НЕЙРОСТЕРОИДЫ КАК МАРКЕРЫ ДЕПРЕССИИ

Тревожные и депрессивные состояния у людей сопровождаются сниженным содержанием НС в крови и в других тканях. У пациентов с социаль-

ной фобией обнаружено сниженное содержание прегненолон-сульфата в крови [68]. DHEA-сульфат и прегненолон-сульфат снижены в крови при депрессии у ВИЧ-инфицированных пациентов [69]. Экзаменационный стресс у аспирантов сопровождается снижением концентрации ALLO в плазме крови, а также снижением рецепторного связывания бензодиазепинов форменными элементами крови [56]. У пациентов с ПТСР снижена концентрация DHEA в крови [70]. Примечательно, что, если у больных ПТСР симптомы отрицательно коррелируют с содержанием ALLO в спинномозговой жидкости, такой корреляции не обнаружено у здоровых людей, имевших в анамнезе схожие психотравмирующие события, но у которых ПТСР не развился [71]. Содержание ALLO и прегнанолон снижено у больных униполярной депрессией как в спинномозговой жидкости [72], так и в крови [73]. Эти показатели увеличивались, приближаясь к норме, после лечения антидепрессантами, ингибирующими обратный захват серотонина [74]. Посмертное исследование мозга депрессивных больных показало сниженную активность 5 α -редуктазы в префронтальной коре [24] и сниженное содержание ALLO в медиальной орбитальной фронтальной коре [75].

Таким образом, содержание НС в тканях может служить дополнительным биологическим маркером большой депрессии и ПТСР [19, 76], что практически важно, поскольку субъективные жалобы таких больных характерны и для многих других психических болезней.

НЕЙРОСТЕРОИДЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АНТИДЕПРЕССАНТЫ

На животных моделях депрессии и ПТСР неоднократно показано, что введение НС ускоряет восстановление нормального поведения животных. Так, андростандиол уменьшает проявления тревоги и улучшает память у мышей [77], препятствует возрастному нарастанию симптомов тревожности, депрессии и когнитивного дефицита у старых самцов мышей, тогда как тестостерон не имеет такого эффекта [78]. У крыс на модели депрессии, вызванной хроническим стрессом длительного опыта поражений при социальных контактах, показан анксиолитический эффект DHEA — время и количество социальных контактов у животных восстанавливаются [70]. Введение DHEA самцам крыс увеличивает устойчивость стрессорной системы, т.е. увеличивает скорость возвращения концентрации кортикостерона к базальным значениям по окончании стрессорного воздействия [70].

DHEA, вероятно, наиболее важный НС человека, поскольку в головном мозге его концентрация выше, чем в крови [79], несмотря на синтез этого стероида в гонадах и в коре надпочечников. Испытания DHEA в клинике депрессий дают ос-

нования для того, чтобы смотреть на этот НС как на перспективный антидепрессант [80]. Однако, метаанализ 14 публикаций делает такой оптимизм осторожным [81]. Таковы же результаты испытаний и ALLO для лечения большой депрессии и ПТСР [19].

Одна из причин неотчетливого терапевтического эффекта в недостаточном объеме выборок, и в том, что помимо НС и плацебо больные принимают одновременно и другие лекарственные препараты: соли лития, антидепрессанты, седативные и анксиолитические препараты, антипсихотики и стимуляторы.

Наибольший успех достигнут в лечении депрессий у женщин, возникающих при резком падении продукции прогестерона, прежде всего при послеродовой депрессии и при предменструальном синдроме (ПМС) и предменструальном дисфорическом расстройстве (ПМДР) [82, 83]. ПМДР (PMDD, premenstrual dysphoric disorder) включено в DSM-5 [84], согласно которому в предшествующие менструации дни должны проявляться пять психологических или соматических симптомов. Если же присутствует только один из них, то заболевание квалифицируется как ПМС.

Как уровень прогестерона, так и уровень его основного метаболита ALLO низок во время менструации и фолликулярной фазы менструального цикла. Вслед за прогестероном, ALLO растет в лютеиновую фазу и быстро снижается перед менструацией. Регулярное воздействие на организм такого фактора, как резкое падение уровня этих половых гормонов может быть ключевым фактором этиологии ПМДР [85, 86]. Результаты экспериментов на животных дают основания для такого предположения.

На модели ПМДР, основанной на подавлении содержания прогестерона в организме, у крыс нарушается социальное взаимодействие и развивается ангедония, что характерно для ПМДР [87]. У крыс и у мышей резкая отмена хронического введения прогестерона сопровождается увеличением тревоги и изменением функций ГАМК/А-рц [86–88]. У двух линий крыс, селектированных по поведенческому признаку, различия в тревожности соответствовали различиям в уровне прогестерона в крови как в стадию проэструса, так и диэструса [89]. У крыс снижение уровня прогестерона во время диэструса сопровождается изменением количества ГАМК/А-рц в околосером проводном сером веществе, структуре, связанной с регуляцией эмоций [90, 91].

Есть все основания считать, что подобные феномены связаны не с самим прогестероном, а с его метаболитом ALLO [92]. Уровень тревожности у страдающих ПМС соответствует соотношению концентраций ALLO и прогестерона в крови [55]. Тяжесть симптомов ПМС отрицательно коррели-

рует с концентрацией ALLO, но не прогестерона [93]. Возможно, что при ПМДР нарушается взаимодействие ALLO с ГАМК/А-рц или же меняется биосинтез ALLO.

Несмотря на то, что внимание исследователей феномена ПМДР и ПМС привлечено к прогестерону и ALLO, результаты этих работ пока не дошли до клиники. Применение селективных ингибиторов обратного захвата серотонина остается “золотым стандартом” терапии ПМС и ПМДР [94].

Иначе обстоит дело с послеродовой депрессией, которая отмечается у 10–20% женщин. Поскольку многократно увеличенная во время беременности продукция прогестерона и ALLO резко падает после родов, этот гормональный сдвиг — очевидный кандидат на причину послеродовой депрессии [95]. При послеродовой депрессии содержание ALLO в крови снижено [96]. Ослабление симптомов послеродовой депрессии соотносится с изменением содержания ALLO в крови [97].

Синтетическое производное ALLO брексанолон под названием Zulresso используется для лечения послеродовой депрессии. Положительный эффект у 70% пациенток отмечен уже через 2–3 дня после начала лечения и сохраняется по крайней мере на протяжении месяца [97, 98]. Быстрый эффект брексанолона — существенное достоинство в сравнении с ингибиторами обратного захвата серотонина, проявляющимися антидепрессивный эффект только после многодневного приема. Высокая стоимость препарата не дает возможность провести широкие исследования для лечения других депрессивных расстройств [99]. Еще один недостаток брексанолона в том, что он применяется исключительно парентерально. Разработанное для перорального введения синтетическое производное ALLO — SAGE-217 — показал при клинических испытаниях тоже быстрый, но умеренный позитивный эффект у депрессивных больных [100, 101].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Много не до конца ясного еще остается в вопросах о роли НС в патогенезе депрессивных расстройств, о механизмах регуляции биосинтеза НС в ЦНС и об удельной роли НС, синтезируемых в ЦНС, и поступающих в мозг с системным кровотоком. Укажем на некоторые интересные экспериментальные факты, требующие изучения и разъяснения.

Если проявление ПМДР однозначно связано с резким снижением концентрации прогестерона и, соответственно, ALLO, то каковы причины исчезновения симптомов ПМДР при наступлении менструации? Продукция прогестерона остается такой же низкой, как и, вероятно, концентрация ALLO, но аффект быстро нормализуется. Проис-

ходит ли сенситизация ГАМК/А-рц, активируются ли ГАМК-ергическая система другими механизмами, или же анксиолитический эффект при наступлении менструации связан с активацией других систем (эндогенных опиатов, эндоканнабиноидов, эндованиллоидов)?

Хорошо известно, что симптомы ПМДР усиливаются при избытке соли в диете [102]. Скорее всего это связано с торможением синтеза минералкортикоида дезоксикортикостерона, метаболит которого THDOC позитивно модулирует ГАМК/А-рц. Непонятно, этот эффект связан с изменением синтеза минералкортикоидов в коре надпочечников или же концентрация ионов натрия также влияет на синтез THDOC в ЦНС?

Острый стресс вызывает рост концентрации ALLO в крови [55, 56, 103, 104], но у женщин с ПМДР такой подъем ALLO не наблюдается [55]. Каковы механизмы этого феномена? Вероятно, это обусловлено нарушением биосинтеза ALLO, но каким именно? Известна различная активность двух ключевых ферментов биосинтеза НС у мужчин и у женщин. При ПТСР у женщин снижается активность 3 α -гидроксистероид дегидрогеназы, а у мужчин — 5 α -редуктазы [71, 105, 106]. Обусловлено ли это разным актуальным гормональным фоном или же это одно из врожденных половых различий?

С половыми различиями стрессорной реакции связывают ДНЕА-сульфат, введение которого кастрированным самцам восстанавливает у них мужской тип стрессорной реакции, т.е. быстрое возвращение кортикостерона к норме, тогда как тестостерон такого эффекта не оказывает [70]. Между тем, содержание ДНЕА у мужчин и у женщин примерно одинаковое [107]. Связан ли ДНЕА и у человека с половыми различиями стрессорной реакции и большей подверженности женщин депрессивным расстройствам?

В заключение обзора напомним, что механизмы действия НС не сводятся только к модуляции ГАМК/А-рц [15]. С другой стороны, в формировании депрессивных состояний важна роль и других веществ стероидной природы, в частности, витамина D [108]. Исследователям важно помнить, что болезни как нозологические категории, несмотря на схожую клиническую картину, могут иметь в своей основе различные нейробиохимические механизмы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chávez-Castillo M., Núñez V., Nava M., Ortega Á., Rojas M., Bermúdez V., Rojas-Quintero J. // *Adv. Pharmacol. Sci.* 2019. 2019:7943481.
2. Corpécho C., Robel P., Axelson M., Sjövall J., Baulieu E.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 4704–4707.
3. Corpécho C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjövall J., Vihko R., Baulieu E.E., Robel P. // *Brain Res.* 1983. V. 270. P. 119–25.
4. Majewska M.D., Harrison N.L., Schwartz R.D., Barker J.L., Paul S.M. // *Science.* 1986. V. 232. P. 1004–1007.
5. Majewska M.D., Schwartz R.D. // *Brain Res.* 1987. V. 404. P. 355–360.
6. Harrison N.L., Vicini S., Barker J.L. // *J. Neurosci.* 1987. V. 7. P. 604–609.
7. Peters J.A., Kirkness E.F., Callachan H., Lambert J.J., Turner A.J. // *Br. J. Pharmacol.* 1988. V. 94. P. 1257–1269.
8. Choi D.W., Farb D.H., Fischbach G.D. // *Nature.* 1977. V. 269. P. 342–344.
9. Reddy D.S. // *Prog. Brain Res.* 2010. V. 186. P. 113–137.
10. Selye H. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1941a. V. 46. P. 116–121.
11. Selye H. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1941b. 73. P. 127–141.
12. Do Rego J.L., Seong J.Y., Burel D., Leprince J., Luu-The V., Tsutsui K., Tonon M.C., Pelletier G., Vaudry H. // *Front. Neuroendocrinol.* 2009. V. 30. P. 259–301.
13. Rudolph L.M., Cornil C.A., Mittelman-Smith M.A., Rainville J.R., Remage-Healey L., Sinchak K., Micevych P.E. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. P. 11449–11458.
14. Balthazart J., Choleris E., Remage-Healey L. // *Horm. Behav.* 2018. V. 99. P. 1–8.
15. González-Orozco J.C., Camacho-Arroyo I. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 503.
16. Zhang M., Weiland H., Schöföbänker M., Zhang W. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 1485.
17. Baulieu E.E., Robel P. // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1990. V. 37. P. 395–403.
18. Paul S.M., Purdy R.H. // *FASEB J.* 1992. V. 6. P. 2311–2322.
19. Maguire J. // *Front. Cell Neurosci.* 2019. V. 13. P. 83.
20. Griffin L.D., Mellon S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 13512–13517.
21. Penning T.M., Jin Y., Heredia V.V., Lewis M. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003. V. 85. P. 247–255.
22. Agís-Balboa R.C., Pinna G., Zhubi A., Maloku E., Veldic M., Costa E., Guidotti A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 14602–14607.
23. Agís-Balboa R.C., Pinna G., Costa E., Guidotti A. // *PNAS.* 2007. V. 104. P. 18736–18741.
24. Agis-Balboa R.C., Guidotti A., Pinna G. // *Psychopharmacology (Berl).* 2014. V. 231. P. 3569–3580.
25. Pinna G., Agis-Balboa R., Pibiri F., Nelson M., Guidotti A., Costa E. // *Neurochem. Res.* 2008. V. 33. P. 1990–2007.
26. Pibiri F., Nelson M., Costa E., Guidotti A., Pinna G. // *PNAS.* 2008. V. 105. P. 5567–5572.

27. Patte-Mensah C., Kappes V., Freund-Mercier M.J., Tsutsui K., Mensah-Nyagan A.G. // J. Neurochem. 2003. V. 86. P. 1233–1246.
28. Costa E., Guidotti A. // Life Sci. 1991. V. 49. P. 325–344.
29. Korneyev A., Pan B.S., Polo A., Romeo E., Guidotti A., Costa E. // J. Neurochem. 1993. V. 61. P. 1515–1524.
30. Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T.R., Knudsen T.B., Lacapère J.J., Lindemann P., Norenberg M.D., Nutt D., Weizman A., Zhang M.R., Gavish M. // Trends Pharmacol. Sci. 2006. V. 27. P. 402–409.
31. Auta J., Romeo E., Kozikowski A., Ma D., Costa E., Guidotti A. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993. V. 265. P. 649–656.
32. Rupprecht R., Rammes G., Eser D., Baghai T.C., Schüle C., Nothdurfter C., Troxler T., Gentsch C., Kalkman H.O., Chaperon F., Uzunov V., McAllister K.H., Bertaina-Anglade V., La Rochelle C.D., Tuerck D., Floesser A., Kiese B., Schumacher M., Landgraf R., Holsboer F., Kucher K. // Science. 2009. V. 325. P. 490–493. Erratum in: Science. 2009. V. 325. P. 1072.
33. Mueller J.W., Gilligan L.C., Idkowiak J., Arlt W., Foster P.A. // Endocr. Rev. 2015. V. 36. P. 526–563.
34. Wu F.S., Gibbs T.T., Farb D.H. // Mol. Pharmacol. 1991. V. 40. P. 333–336.
35. Bowlby M.R. // Mol. Pharmacol. 1993. V. 43. P. 813–9.
36. Park-Chung M., Wu F.S., Purdy R.H., Malayev A.A., Gibbs T.T., Farb D.H. // Mol. Pharmacol. 1997. V. 52. P. 1113–1123.
37. Vyklícky V., Smejkalová T., Krausová B., Balik A., Korinek M., Borovská J., Horák M., Chvojková M., Kleťecková L., Vales K., Černý J., Nekardová M., Chodounská H., Kudová E., Vyklícky L. // J. Neurosci. 2016. V. 36. P. 2161–2175.
38. Flood J.F., Morley J.E., Roberts E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 10806–10810.
39. Smith C.C., Martin S.C., Sugunan K., Russek S.J., Gibbs T.T., Farb D.H. // Mol. Pharmacol. 2014a. V. 86. P. 390–398.
40. Smith C.C., Gibbs T.T., Farb D.H. // Psychopharmacology (Berl). 2014b. V. 231. P. 3537–3556.
41. Scullin C.S., Partridge L.D. // Hippocampus. 2012. V. 22. P. 2184–2198.
42. Reddy D.S., Gangisetty O., Wu X. // Brain Res. 2017. V. 1659. P. 142–147.
43. Schüle C., Nothdurfter C., Rupprecht R. // Prog. Neurobiol. 2014. V. 113. P. 79–87.
44. Marx C.E., Lee J., Subramaniam M., Rapisarda A., Bautista D.C., Chan E., Kilts J.D., Buchanan R.W., Wai E.P., Verma S., Sim K., Hariram J., Jacob R., Keefe R.S., Chong S.A. // Psychopharmacology (Berl). 2014. V. 231. P. 3647–3662.
45. Kreinin A., Bawakny N., Ritsner M.S. // Clin. Schizophr. Relat. Psychoses. 2017. V. 10. P. 201–210.
46. Herzog A.G. // Neurology. 1986. V. 36. P. 1607–1610.
47. Reddy D.S. // Horm. Behav. 2013. V. 63. P. 254–266.
48. Ratner M.H., Kumaresan V., Farb D.H. // Front. Endocrinol. 2019. V. 10:169.
49. Wu F.S., Gibbs T.T., Farb D.H. // Mol. Pharmacol. 1990. V. 37. P. 597–602.
50. Borowicz K.K., Piskorska B., Banach M., Czuczwar S.J. // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2011. V. 2:50.
51. Purdy R.H., Morrow A.L., Moore P.H., Paul, S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 4553–4557.
52. Barbaccia M.L., Serra M., Purdy R.H., Biggio G. // Neuroster. Brain Funct. 2001. V. 46. P. 243–272.
53. Akk G., Covey D.F., Evers A.S., Steinbach J.H., Zorumski C.F., Mennerick S. // Pharmacol. Ther. 2007. V. 116. P. 35–57.
54. Genazzani A.R., Petraglia F., Bernardi F., Casarosa E., Salvestroni C., Tonetti A., Nappi R.E., Luisi S., Palumbo M., Purdy R.H., Luisi M. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998. V. 83. P. 2099–2103.
55. Girdler S.S., Straneva P.A., Light K.C., Pedersen C.A., Morrow A.L. // Biol. Psychiatry. 2001. V. 49. P. 788–797.
56. Droogleever Fortuyn H.A., van Broekhoven F., Span P.N., Bäckström T., Zitman F.G., Verkes R.J. // Psychoneuroendocrinology. 2004. V. P. 1341–1344.
57. Serra M., Sanna E., Mostallino M.C., Biggio G. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2007. V. 17. P. 1–11.
58. Evans J., Sun Y., McGregor A., Connor B. // Neuropharmacology. 2012. V. 63. P. 1315–1326.
59. Owens M.J., Ritchie J.C., Nemeroff, C.B. // Brain Res. 1992. V. 573. P. 353–355.
60. Patchev V.K., Hassan A.H., Holsboer D.F., Almeida O.F. // Neuropsychopharmacology. 1996. V. 15. P. 533–540.
61. Patchev V.K., Shoaib M., Holsboer F., Almeida O.F. // Neuroscience. 1994. V. 62. P. 265–271.
62. Guo A.L., Petraglia F., Criscuolo M., Ficarra G., Nappi R.E., Palumbo M.A., Trentini G.P., Purdy R.H., Genazzani A.R. // Gynecol. Endocrinol. 1995. V. 9. P. 1–7.
63. Sarkar J., Wakefield S., Mackenzie G., Moss S.J., McGuire, J. // J. Neurosci. 2011. V. 31. P. 18198–18210.
64. Nelson M., Pinna G. // Neuropharmacology. 2011. V. 60. P. 1154–1159.
65. Almeida F.B., Nin M.S., Barros H.M.T. // Neurobiol. Stress. 2020. V. 12:100218.
66. Locci A., Pinna G. // Br. J. Pharmacol. 2017. V. 174. P. 3226–3241.
67. Pinna G. // Front. Behav. Neurosci. 2019. V. 13. P. 114.
68. Heydari B., Le Mellédo J.M. // Psychol. Med. 2002. V. 32. P. 929–933.
69. Mukerji S.S., Misra V., Lorenz D.R., Chettimada S., Keller K., Letendre S., Ellis R.J., Morgello S., Parker R.A., Gabuzda D. // J. Infect. Dis. 2020. Mar 10:jjaa104.
70. Обут Т.А., Сарыг С.К., Эрдыниева Т.А., Обут Е.Т. Интегративная роль дегидроэпиандростерон-сульфата в межэндокринной регуляции. Новосибирск: Омега Принт, 2010. 122 с.
71. Rasmusson A.M., King M.W., Valovski I., Gregor K., Scioli-Salter E., Pineles S.L., Hamouda M., Nillni Y.I., Anderson G.M., Pinna G. // Psychoneuroendocrinology. 2019. V. 102. P. 95–104.
72. Uzunova V., Sheline Y., Davis J.M., Rasmusson A., Uzunov D.P., Costa E., Guidotti A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 3239–3244.
73. Schüle C., Romeo E., Uzunov D.P., Eser D., di Michele F., Baghai T.C., Pasini A., Schwarz M., Kempter H., Rupprecht R. // Mol. Psychiatry. 2006. V. 11. P. 261–272.
74. Romeo E., Ströhle A., Spalletta G., di Michele F., Hermann B., Holsboer F., Pasini A., Rupprecht R. // Am. J. Psychiatry. 1998. V. 155. P. 910–913.

75. Cruz D.A., Glantz L.A., McGaughey K.D., Parke G., Shampine L.J., Kilts J.D., Naylor J.C., Marx C.E., Williamson D.E. // *Chronic Stress* (Thousand Oaks). 2019. V. 3: 2470547019838570.
76. Almeida F.B., Barros H.M.T., Pinna G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 1758.
77. Osborne D.M., Edinger K., Frye C.A. // *Age (Dordr.)*. 2009. V. 31. P. 119–126.
78. Frye C.A., Edinger K.L., Lephart E.D., Walf A.A. // *Front. Aging Neurosci.* 2010. V. 2. P. 15.
79. Maninger N., Wolkowitz O.M., Reus V.I., Epel E.S., Mellon S.H. // *Front. Neuroendocrinol.* 2009. V. 30. P. 65–91.
80. Peixoto C., Grande A.J., Mallmann M.B., Nardi A.E., Cardoso A., Veras A.B. // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2018. V. 17. P. 706–711.
81. Peixoto C., José Grande A., Gomes Carrilho C., Nardi A.E., Barciela Veras A. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. P. 2510–2528.
82. Peltier M.R., Verplaetse T.L., Mineur Y.S., Gueorguieva R., Petrakis I., Cosgrove K.P., Picciotto M.R., McKee S.A. // *Neuropharmacology*. 2021. V. 187:108499.
83. Schweizer-Schubert S., Gordon J.L., Eisenlohr-Moul T.A., Meltzer-Brody S., Schmalenberger K.M., Slopien R., Zietlow A.L., Ehler U., Ditzgen B. // *Front. Med. (Lausanne)*. 2021. V. 7:479646.
84. Epperson C.N., Steiner M., Hartlage S.A., Eriksson E., Schmidt P.J., Jones I., Yonkers K.A. // *Am. J. Psychiatry*. 2012. V. 169. P. 465–475.
85. Жуков Д.А. Биологические основы поведения. Гуморальные механизмы. С.-Пб, Издательство Р. Асланова “Юридический центр Пресс”, 2004. 453 с. ISBN 5-94201-325-X
86. Smith S.S., Ruderman Y., Frye C., Homanics G., Yuan M. // *Psychopharmacology (Berl.)*. 2006. V. 186. P. 323–333.
87. Li Y., Pehrson A.L., Budac D.P., Sánchez C., Gulinello M. // *Behav. Brain Res.* 2012. V. 234. P. 238–247.
88. Schneider T., Popik P. // *Curr. Protoc. Neurosci.* 2009. Chapter 9:Unit 9.31.
89. Zhukov D.A., Arutunan N.A., Vinogradova E.P. // *Integrative Physiology*. 2020. V. 1. P. 155–159.
90. Griffiths J.L., Lovick T.A. // *Neuroscience*. 2005. V. 136. P. 457–466.
91. Lovick T.A. // *Exp. Physiol.* 2006. V. 91. P. 655–660.
92. Bäckström T., Haage D., Löfgren M., Johansson I.M., Strömberg J., Nyberg S., Andréen L., Ossewaarde L., van Wingen G.A., Turkmen S., Bengtsson S.K. // *Neuroscience*. 2011. V. 191. P. 46–54.
93. Dichtel L.E., Lawson E.A., Schorr M., Meenaghan E., Paskal M.L., Eddy K.T., Pinna G., Nelson M., Rasmussen A.M., Klibanski A., Miller K.K. // *Neuropsychopharmacology*. 2018. V. 43. P. 1436–1444.
94. Hantsoo L., Epperson C.N. // *Curr. Psychiatry Rep.* 2015. V. 17. P. 87.
95. Zorumski C.F., Paul S.M., Covey D.F., Mennerick S. // *Neurobiol. Stress*. 2019. V. 11:100196.
96. Nappi R.E., Petraglia F., Luisi S., Polatti F., Farina C., Genazzani A.R. // *Obstet. Gynecol.* 2001. V. 97. P. 77–80.
97. Kanes S., Colquhoun H., Gunduz-Bruce H., Raines S., Arnold R., Schacterle A., Doherty J., Epperson C.N., Deligiannidis K.M., Riesenberger R., Hoffmann E., Rubinow D., Jonas J., Paul S., Meltzer-Brody S. // *Lancet*. 2017. V. 390. P. 480–489.
98. Meltzer-Brody S., Colquhoun H., Kanes S. // *Lancet*. 2018. V. 392. P. 1058–1070.
99. Faden J., Citrome L. // *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 2020. V. 10:2045125320968658.
100. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA, 2018, <http://clinicaltrials.gov/show/NCT03000530>.
101. Gunduz-Bruce H., Silber C., Paul S.M., Kanes S.J. // *N. Engl. J. Med.* 2019. P. 381. P. 903–911.
102. Aguilar-Aguilar E. // *Nutr. Hosp.* 2021. V. 37. P. 52–56. Spanish.
103. Klatzkin R.R., Morrow A.L., Light K.C., Pedersen C.A., Girdler S.S. // *Psychoneuroendocrinology*. 2006. V. 31. P. 1208–1219.
104. Crowley S.K., Girdler S.S. // *Psychopharmacology (Berl.)*. 2014. V. 231. P. 3619–3634.
105. Pineles S.L., Nillni Y.I., Pinna G., Webb A., Arditte Hall K.A., Fonda J.R., Irvine J., King M.W., Hauger R.L., Resick P.A., Orr S.P., Rasmussen A.M. // *Neurobiol. Stress*. 2020. V. 13:100225.
106. Pinna G. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2020. V. 11. P. 236. Erratum in: *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2020. V. 11. P. 507.
107. Hester J., Ventetulo C., Lahm T. // *Compr. Physiol.* 2019. V. 10. P. 125–170.
108. Berridge M.J. // *Pharmacol. Rev.* 2017. V. 69. P. 80–92.

Neurosteroids and Depression

D. A. Zhukov^a and E. P. Vinogradova^b

^a*Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Russia*

^b*Biological Faculty SPBU, St. Petersburg, Russia*

Neurosteroids are steroids that rapidly alter neuronal excitability through interaction with cell surface receptors, mainly with GABA/A receptor complex. Neurosteroids are synthesized both in the central nervous system and in peripheral tissues from which they enter the brain with systemic blood flow. Neurosteroids may regulate emotional behavior, therefore, they can be an important factor for the development of depressive disorders: major depression, post-traumatic stress disorder, premenstrual dysphoric disorder, postpartum depression. Studies of neurosteroids offer opportunities for new treatments for depressive disorders.

Keywords: neurosteroids, depression

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 616-08

ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИКАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ЦЕНТРА I СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ГИПОХЛОРИТОМ НАТРИЯ МЕТОДОМ РАЗРЕШЕННОЙ ВО ВРЕМЕНИ ФЛУОРЕСЦЕНТОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2021 г. Т. И. Сырейщикова¹*, Н. В. Смолина², М. Г. Узбеков², В. И. Бриллиантова²,
Е. Д. Сыромятникова¹, Г. Е. Добрецов³

¹Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, Россия

²ФГБУ Московский научно-исследовательский институт психиатрии, Москва, Россия

³ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.03.2021 г.

После доработки 15.03.2021 г.

Принята к публикации 17.03.2021 г.

Проведено измерение кинетики затухания флуоресценции зонда К-35 и аминокислотного остатка триптофана (Trp) при добавлении гипохлорита натрия в альбуминовую фракцию сыворотки крови здорового донора (HSA). Флуоресцентный зонд К-35 (возбуждение 405 нм, флуоресценция 530 нм) связывается с I лекарственным центром альбумина. Во время эксперимента молярная концентрация альбумина во фракции изменялась от 0.3 до 20 мкМ. Окисление фракции гипохлоритом регистрировали по изменению флуоресценции Trp, также расположенного в I центре альбумина (возбуждение 290 нм, флуоресценция 350 нм). Было показано, что при молярной концентрации альбумина в сыворотке крови порядка 30 мкМ HSA проявляет антиоксидантную активность, позволяющую ему поддерживать свои функции даже после воздействия относительно больших количеств гипохлорита (до 50 молекул окислителя на молекулу белка). HSA сохраняет свою способность к связыванию лигандов, так как свойства зонда К-35 при окислении остались практически неизменными, зарегистрированы лишь незначительные изменения в характеристиках связывания. Добавленный гипохлорит в первую очередь расходуется на окисление аминокислот альбумина, в том числе на наблюдаемое в эксперименте окисление Trp. Для 14 сывороток доноров показано достоверное отличие флуоресценции триптофана, окисленного и нативного.

Ключевые слова: флуоресцентный зонд, аминокислотный остаток Trp, затухание флуоресценции, метод разрешенной во времени флуоресценции, гипохлорит натрия

DOI: 10.31857/S1027813321030122

ВВЕДЕНИЕ

Сывороточный альбумин человека (human serum albumin, HSA) существует в организме человека как в нативной, так и в окисленной формах. Большинство биомолекул (липиды, белки, ДНК) являются мишенью для окислителей и страдают от окислительного стресса. Окисление белков может изменить их первичные структуры, привести к фрагментации или олигомеризации, и изменить их функциональные способности. Высказывается предположение, что повышенный уровень окисленного сывороточного альбумина человека может приводить к ряду патологических состояний. Окисление гипохлоритом натрия считается важным процессом в прогрессе некоторых болез-

ней, включающих атеросклероз, воспалительные заболевания кишечника, гепатит, инфаркт миокарда, шизофрению, онкологические заболевания и некоторые другие патологии, вызванных окислительным стрессом [1–4]. В литературе отмечается, что в настоящее время недостаточно знаний о функциональной связи между свойствами нативного и окисленного альбумина [2], и о патофизиологическом значении окисления альбумина. Альбумин обратимо связывает многие эндогенные и экзогенные низкомолекулярные соединения, в том числе l-try, жирные кислоты, билирубин и лекарственные соединения. Он также играет важную роль в транспортировке этих соединений к цели. Два основных связывающих центра лигандов на молекуле альбумина обозначаются как лекарственные сайты I и II [5].

* Адресат для корреспонденции: 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: syrejshchikovati@lebedev.ru.

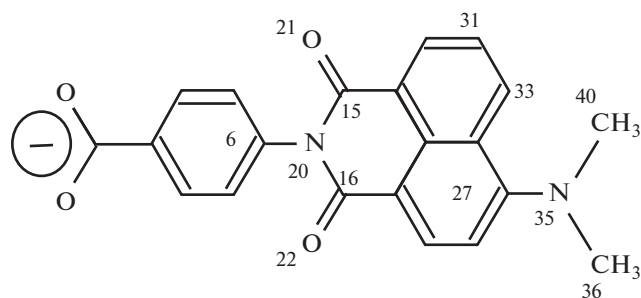


Рис. 1. Молекула флуоресцентного зонда К-35. Ионная форма в водном растворе при pH 7. Показана нумерация атомов.

Известно, что сам по себе альбумин является основным защитным белком плазмы за счет его способности перехватывать свободные радикалы. Протекторные свойства альбумина проявляются в первую очередь благодаря наличию SH-групп цистеина (Cys) [6]. Некоторый вклад в это могут вносить 6 остатков другой аминокислоты — метионина, также весьма чувствительные к окислению. Наконец, ароматические аминокислоты также обладают выраженными антиоксидантными свойствами [2]. Последний факт подкреплен нашим экспериментальным материалом по триптофану (данная статья).

В настоящей работе в качестве окислителя использовался гипохлорит натрия. Гипохлорит натрия образуется в организме человека при воспалительных процессах (в лейкоцитах, точнее в нейтрофилах) [7–10]. При инфицировании крови бактериями последние активируют лейкоциты, что сопровождается выделением сильного окислителя — гипохлорита натрия. Гипохлорит защищает организм человека от микроорганизмов. В растворе гипохлорит (NaOCl) находится в динамическом равновесии с хлорноватистой кислотой (HOCl): $\text{NaOCl} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOCl} + \text{Na}^+$. Именно HOCl является сильнейшим окислителем и необходим для борьбы с инфектами. Гипохлорит химически взаимодействует с белком (почти мгновенно): в результате реакции HOCl с аминоклуппами белка образуются долгоживущие хлорамины [2]. Получается, что гипохлорит как бы “сорбируется” на белке, превратившись при этом в хлорамины. Из хлораминов возникают радикалы, которые способствуют HOCl-индуцируемому окислению белков плазмы.

Основное внимание в нашей статье обращено на изучение связывающей способности центрами альбумина лигандов и лекарственных соединений. В литературе есть сведения, что окисление HSA не оказывает заметного влияния на связывание лекарственных соединений с сайтом I в поддомене IIА [11–13].

Цель работы состояла в изучении свойств связывающего лекарственного центра I альбумина сыворотки крови человека при его окислении гипохлоритом натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кровь доноров забирали натощак, сыворотку получали стандартным способом, все образцы хранили при -30°C . Из сывороток выделяли альбуминовую фракцию с помощью двухфазной системы полиэтиленгликоль 3000/буфер PBS (pH 7.4) [14]. Альбуминовые фракции сывороток крови доноров разбавляли в 10 раз буфером PBS (Sigma-Aldrich, США), содержащем 0.137 M NaCl и 0.01 M фосфата натрия, pH 7.4. В качестве окислителя использовался гипохлорит натрия с молярной концентрацией 1 mM (примерно 50 молекул гипохлорита на 1 молекулу альбумина). Во всех фракциях были измерены концентрации альбумина с помощью метода бромкрезоловых красителей [15]. Молярная концентрация альбумина в исследованных альбуминовых фракциях сывороток крови в среднем была равна около 20 мкМ. Среднеквадратичная вариация среднего значения концентрации альбумина составляет 10%. Концентрация зонда К-35 составляла 20 мкМ.

Степень окисления рассчитывалась, как и в работе [7], по изменению суммарного выхода флуоресценции триптофана. Молекула флуоресцентного зонда К-35 изображена на рис. 1.

Измерения кинетики затухания флуоресценции зонда К-35 были выполнены в Физическом институте им П.П. Лебедева РАН на установке с пульсирующим источником света (LED) фирмы Pico-Quant (длина волны излучения 459 нм, длина волны флуоресценции 530 нм) [16]. Измерения флуоресценции триптофана (Trp) проводились при длинах волн излучения и флуоресценции 290 и 350 нм (LED 290 nm Pico-Quant).

Основная работа проведена на частоте 10 MHz при максимальной оптической мощности 30 μW. В качестве детектора фотонов использовался фотоэлектронный умножитель Hamamatsu (PMA-182). Для коррелированного во времени счета одиночных фотонов флуоресценции использовался PCIBoard TimeHarp 200 (фирма Pico-Quant). Время-амплитудный конвертор содержит 4096 каналов регистрации фотонов с шириной канала в 33 пикосекунды. Длительность импульсов возбуждающего излучения около 700 пикосекунд. На базе персонального компьютера типа AMD Sempron автоматизированы как процесс измерения, так и обработка экспериментальных данных (Программы TimeHarp и FluoFit фирмы Pico-Quant) [16].

В используемой нами технике измерений экспериментально измеряемая функция затухания

Таблица 1. Средние значения параметров флуоресценции Тгр и ошибки их средних для 14 исследованных сывороток доноров ($M \pm m$ (14))

Группа	A1	A2	A3	A1/A3	A1/A2	A2/A3
Донор	431 $\pm$ 19	569 $\pm$ 20	287 $\pm$ 17	1.51 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.01	1.99 $\pm$ 0.06
Окисл. донор	237 $\pm$ 12	377 $\pm$ 20	242 $\pm$ 15	1.02 $\pm$ 0.08	0.63 $\pm$ 0.02	1.60 $\pm$ 0.07
Донор/окисл. донор	1.82 $\pm$ 0.04	1.51 $\pm$ 0.04	1.19 $\pm$ 0.04	1.48 $\pm$ 0.04	1.21 $\pm$ 0.04	1.24 $\pm$ 0.04

флуоресценции $I(t)$ и реальная функция затухания флуоресценции $F(t)$ связаны с помощью свертки:

$$I(t) = \int_0^{\infty} L(t')F(t-t')dt', \quad (1)$$

где $L(t)$ — профиль возбуждающего импульса. При решении свертки $F(t)$ выражалась как аналитическая функция с несколькими неизвестными параметрами. Она сворачивалась с профилем возбуждающего импульса и затем сравнивалась с функцией $I(t)$. Использовался метод наименьших квадратов и χ^2 критерий. Лучшие параметры фитирования соответствовали минимуму χ^2 .

Флуоресценция зонда K-35 и Тгр фитировалась суммой трех экспонент (программа FluoFit фирмы Pico-Quant):

$$F(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + A_3 \exp(-t/\tau_3). \quad (2)$$

В уравнении 2 A_i — амплитуды, τ_i — времена затухания флуоресценции, соответствующие трем связывающим центрам альбумина сыворотки крови.

Для статистического анализа достоверности различия амплитуд флуоресценции триптофана в 14 сыворотках доноров, не окисленных и с окислением гипохлоритом натрия, использовалась программа Statistica версии 10. Методом непараметрической статистики проведено сравнение 2-х выборок с помощью критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение флуоресценции Тгр. Одиночный аминокислотный остаток триптофана Тгр расположен в I лекарственном центре альбумина. Проведено измерение внутренней флуоресценции триптофана в альбуминовых фракциях сывороток крови 12 здоровых доноров в естественных условиях и после добавления окислителя — гипохлорита натрия. Флуоресценция триптофана в альбуминовых фракциях не является гетерогенной и фитировалась суммой трех экспонент с помощью уравнения (2). Согласно широко известной модели ротамера [17], эти три времени жизни могут быть связаны с тремя возможными конформационными состояниями триптофана в HSA.

Молярная концентрация альбумина в исследованных альбуминовых фракциях сывороток крови человека в среднем была около 20 мкМ. В пределах средне-квадратических ошибок средние значения 3-х времен затухания флуоресценции всех центров аминокислотного остатка триптофана практически не меняются с окислением и равны 6.5, 2.7 и 0.9 нс. Наибольшее изменение при окислении испытывает амплитуда долгоживущей компоненты A1.

В табл. 1 приведены средние параметры флуоресценции Тгр и ошибки их средних $M \pm m$ (14).

Из табл. 1 видно, что все амплитуды закона затухания флуоресценции падают с окислением (молярная концентрация гипохлорита 1 мМ). Анализ экспериментальных данных с помощью программы Statistica-10 показал, что все амплитуды A_i во фракциях нативных доноров достоверно различаются (с уровнем $p = 0.01$ по критерию Вилкоксона) от амплитуд тех же фракций с добавлением гипохлорита.

На рис. 2 приведена зависимость окисления триптофана альбуминовой фракции от концентрации добавляемого гипохлорита. Степень окисления фракции гипохлоритом рассчитывалась как: $\Delta = [F(0) - F(C)]/F(0)$, где $F(C)$ — суммарная интенсивность флуоресценции триптофана при молярной концентрации гипохлорита (C), $F(0)$ — интенсивность флуоресценции триптофана без гипохлорита

Было проведено титрование гипохлоритом натрия альбуминовой фракции сыворотки здорового донора с молярной концентрацией 20 мкМ (рис. 1) и показано, что даже после воздействия относительно больших количеств гипохлорита (вплоть до 50 молекул окислителя на молекулу альбумина) кривая зависимости интенсивности флуоресценции триптофана остается линейной функцией от концентрации гипохлорита.

Был проведен эксперимент по измерению зависимости от времени окисления альбуминовой фракции гипохлоритом натрия с молярной концентрацией 1 и 0.5 мМ. Эксперимент показал, что окисление альбумина гипохлоритом таких концентраций происходит быстро — не больше двух-трех минут (рис. 2, 3). Реальное время, возможно, еще меньше, так как начальное минимальное время измерений определяется условиями экспе-

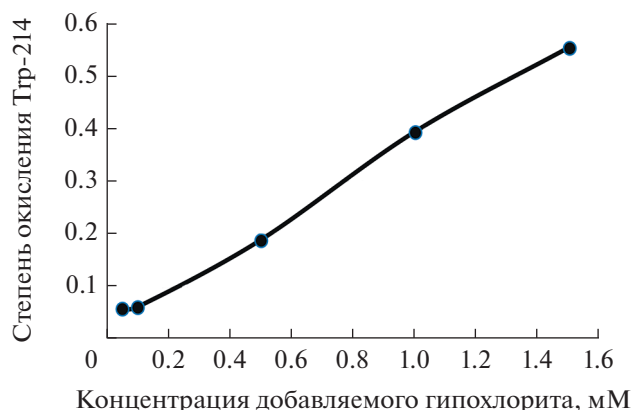


Рис. 2. Степень окисления триптофана в зависимости от концентрации гипохлорита.

римента. Инкубация гипохлоритом в эксперименте длилась 1 ч.

Здесь уместно рассмотреть работу, в которой также флуоресцентными методами исследовалось влияние гипохлорита на лекарственный центр I модельного альбумина [11]. В работе также было показано, что NaOCl почти полностью потребляется в течение нескольких минут в присутствии аминокислот или белков. Несмотря на это, измерения окисления выполнялись в этой работе после 60 мин инкубации, чтобы стандартизовать вторичный ущерб из-за разложения первоначально образовавшихся хлораминов.

Измерения флуоресценции зонда К-35. Основная задача эксперимента состояла в изучении влияния окисления белка на связывающую способность его I лекарственного центра. Такая же задача ставилась и в обсуждаемой выше работе [11]. Там изучалось взаимодействие обезжиренного модельного (Sigma) альбумина и гипохлорита натрия (NaOCl). Показано, что NaOCl уменьшает количество активных сайтов. Однако, остальные сайты имеют сродство к субстрату равное или даже больше, чем те, которые присутствуют в нативном белке.

Исследуя флуоресценцию зонда К-35 (лиганда), связывающегося с лекарственным центром альбумина I, мы исследовали возможность окисления гипохлоритом и других лигандов — лекарств. Очевидно, зонд К-35, связываясь с альбумином, попадает в гетерогенное окружение, которое меняется в течение времени контакта между белком и флуоресцентным зондом. Для изучения этой гетерогенности была использована разрешенная во времени субнаносекундная флуоресцентная спектроскопия, позволяющая регистрировать малые локальные изменения и избирательно следить за состоянием связывающих центров альбумина. Измерялась кинетика затухания флуоресценции зонда К-35. В воде К-35 практически не флуоресцирует, поэтому флуоресценция исходит только

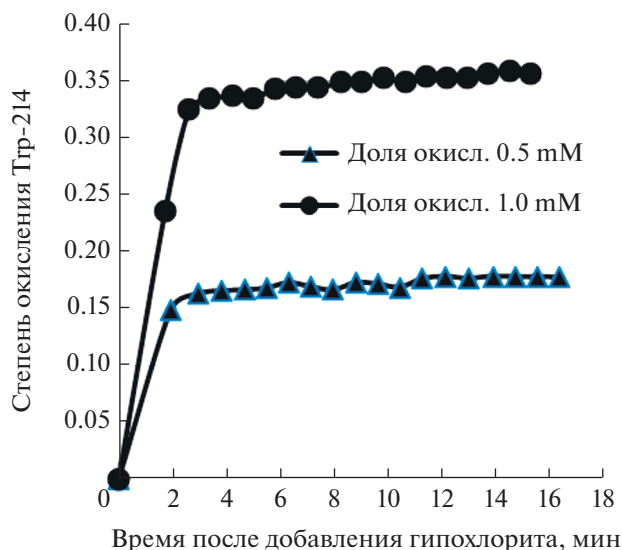


Рис. 3. Изменение доли окисления триптофана гипохлоритом со временем при двух молярных концентрациях гипохлорита.

от молекул зонда, связанных с HSA. Компьютерная обработка данных, передающих временной ход кривой затухания флуоресценции К-35 (программа FluoFit), показала, что наиболее точно регистрируемая кривая (интенсивность свечения зонда $F(t)$) может быть представлена как сумма трех экспоненциальных слагаемых (см. выше уравнение (2)).

В альбумине времена затухания зонда составляют около 9, 3 и 1 нс. В воде выход флуоресценции К-35 чрезвычайно низок, поэтому среднее время затухания намного ниже 1 нс. Данные о флуоресценции К-35 свидетельствуют в пользу предположения о том, что молекулы всех трех “базовых” типов локализируются в I лекарственном центре. После многочисленных экспериментов [18–24] было сделано предположение, что время затухания флуоресценции зонда связано со степенью сольватации его молекулы молекулами воды. По-видимому, вода нужна для флуоресценции, но не как сплошная водная фаза, а как ограниченное количество полярных молекул, сольватирующих определенные места молекулы зонда (скорее всего это два карбонильных атома кислорода и аминогруппа). Вероятно, в альбумине зонд образует 3 типа сольватных комплексов, поскольку при разных условиях мы видим 3 устойчивых времени затухания с амплитудами A_i и соответствующими временами затухания. При возбуждении зонда возникают три различных дискретных состояния молекул зонда, связанных с тушащим действием воды. Первое τ_1 около 9 нс, вероятно, получается при локализации зонда в глубине молекулы альбумина, в которой существует глубокий гидрофобный карман. Меньшие времена затухания могут соответ-

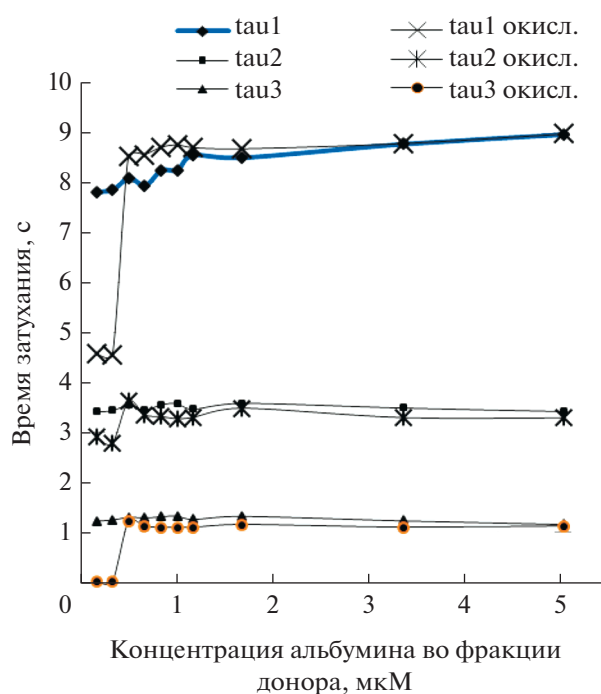


Рис. 4. Изменение времен затухания флуоресценции K-35 при окислении гипохлоритом натрия в зависимости от концентрации альбумина во фракции донора.

ствовать более поверхностному размещению зондов K-35 в альбумине и наличию молекул воды.

Поведение альбумина крови как антиоксиданта хорошо видно при измерении кинетики затухания флуоресценции зонда K-35 при добавлении окислителя — гипохлорита натрия во фракции сыворотки донора при различной концентрации альбумина. Измерения проводились в естественном состоянии сыворотки и при добавлении 1 мМ гипохлорита натрия. Получено, что при малой молярной концентрации альбумина (до 0.7 мкМ) в связывающих центрах альбумина происходят изменения как времен затухания, так и амплитуд. При концентрациях альбумина менее 0.7 мкМ самое большое время затухания уменьшается почти в 2 раза (от 8.5 до 4.5 нс). Среднее время почти не изменяется, а третье (меньшее время) — практически исчезает. При увеличении молярной концентрации альбумина свыше 1 мкМ окислитель начинает перехватываться альбумином. Все времена практически скачком возвращаются к своим значениям до окисления. Появляется и самое маленькое время — порядка 1 нс.

Вероятно, при малых концентрациях альбумина в центрах связывания лигандов с альбумином мы наблюдаем химическую реакцию между гипохлоритом и альбумином. В конкуренции между центрами связывания лигандов и аминокислотами здесь в начале побеждает связывание зонда K-35 с центрами альбумина. При дальнейшем увеличении

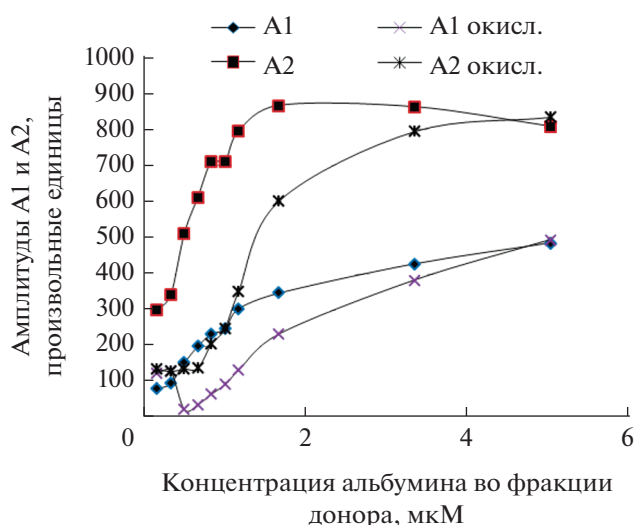


Рис. 5. Изменение амплитуд A1 и A2 функции затухания флуоресценции зонда K-35 в альбуминовой фракции сыворотки донора при окислении гипохлоритом натрия в зависимости от концентрации альбумина во фракции донора.

молярной концентрации альбумина гипохлорит переходит к окислению аминокислот и не трогает центры связывания лигандов.

Из рис. 4–6 видно, что при увеличении молярной концентрации альбумина во фракциях крови доноров амплитуды при наличии гипохлорита натрия начинают приближаться к амплитудам в естественном состоянии. Наши результаты показали, что альбумин при его естественной концентрации в плазме крови способен защищать транспортируемые молекулы от гипохлорита. Антиоксидантная активность HSA позволяет белку поддерживать свои функции в естественных условиях. Добавленный гипохлорит в первую очередь расходуется на обширное окисление аминокислот, о чем в нашем эксперименте свидетельствует потеря флуоресценции Trp.

Изменения амплитуд флуоресценции K-35 при окислении гипохлоритом молярной концентрации 1 мМ и молярной концентрации альбумина во фракции донора 20 мкМ составляют: 1.065 ± 0.04 , 1.063 ± 0.06 , 0.907 ± 0.06 .

Из этого следует, что изменения свойств связывающего лекарственного центра I при окислении гипохлоритом натрия практически не происходит.

Исследуя окисление зонда K-35 (лиганда), связывающегося с I лекарственным центром альбумина, мы исследовали окисление гипохлоритом и других лигандов — лекарственных соединений. Наши результаты показали, что альбумин способен защищать транспортируемые молекулы от модификации гипохлоритом, добавленным в концен-

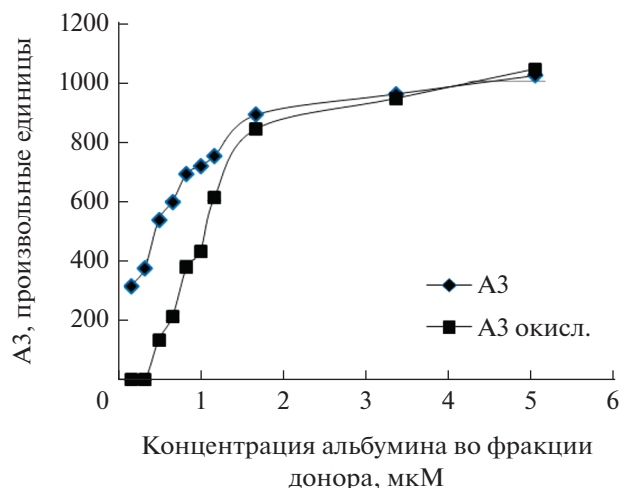


Рис. 6. Изменение амплитуды A3 функции затухания флуоресценции зонда K-35 в альбуминовой фракции сыворотки донора при окислении гипохлоритом натрия в зависимости от концентрации альбумина во фракции донора.

трациях, сопоставимых с концентрациями гипохлорита, вырабатываемого организмом человека в очаге воспаления. Это согласуется с приводимым в литературе утверждением, что альбумин сыворотки крови человека (HSA) является “жертвенным” антиоксидантом, нейтрализующим окислители своими химически активными группами (различными аминокислотными остатками, прежде всего тиоловой группой остатка Cys C); при этом сам HSA подвергается необратимой химической модификации.

Изучение кинетики затухания флуоресценции триптофана показало, что взаимодействие этого аминокислотного остатка с окислителем приводит к сильному уменьшению флуоресценции триптофана. Его флуоресценция в долгоживущем центре (амплитуда A1) изменяется в 1.8 раза.

ВЫВОДЫ

Результаты эксперимента показали, что свойства зонда, связанного с I лекарственным центром, практически не изменились при окислении гипохлоритом натрия. Гипохлорит натрия не изменяет связывающую способность зонда K-35 в молекулах альбумина в сыворотках здоровых людей и, следовательно, свою способность связывать лекарственные вещества, также являющиеся лигандами. Наши наблюдения подтверждают, что альбумин способен выполнить свою транспортную роль даже после прогрессивного окисления в течение всего срока службы молекулы альбумина. Если лиганд типа лекарства связывается с лекарственным центром I, то HSA может защитить такой лиганд от окислителя — гипохлорита натрия.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при бюджетном финансировании. Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все пациенты-волонтеры, у которых бралась кровь, дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией об этических принципах проведения медицинских исследований с участием людей и заключением локального этического комитета Московского научно-исследовательского института психиатрии.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Colombo G., Clerici M., Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Dalle Donne // *Antioxid. Redox Signal.* 2012. V. 17. P. 1515–1527.
2. Sozarukova M.M., Proskurnina E.V., Vladimirov Yu.A. // *Bull. RSMU.* 2016. № 1. P. 56–61.
3. Pattison D.I., Davies M.J. // *Curr. Med. Chem.* 2006. V. 13. P. 3271–3290.
4. Anraku M., Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M. // *Pharm. Res.* 2001. V. 18. P. 632–639.
5. Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. // *Mol. Pharmacol.* 1975. V. 11. P. 824–832.
6. Graziano Colombo, Marco Clerici, Alessandra Altomare, Francesco Rusconi, ... Aldo Milzani // *J. Proteomics.* 2017. V. 152. P. 22–32.
7. Clare L. Hawkins, Michael J. Davies // *Biochem. J.* 1999. V. 340. P. 539–548 (Printed in Great Britain).
8. Robaszkiewicz A., Bartosz G., Soszynki M. // *Free Rad. Res.* 2008. V. 42. P. 30–39.
9. Chekanov A.V., Panasenko O.M., Osipov A.N., Matveeva N.S., Kazarinov K.D., Vladimirov Iu.A., Sergienko V.I. // *Biophysics.* 2005. V. 50. № 1. P. 13–19.
10. Arnhold J., Hammerschmidt S., Wagner M., Mueller S., Arnold K., Grimm E. // *Biomed. Biochim. Acta.* 1990. V. 49. P. 991–997.
11. Eduardo Lissi, M. Alicia Biasutti, Elsa Abuin, Luis Leyn // *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2009. V. 94. P. 77–81.
12. Asami Kawakami, Kazuyuki Kubota, Naoyuki Yamada, Uno Tagami, Kenju Takehana, Kenji Takehana, Ichiro Sonaka, Eiichiro Suzuki, Kazuo Hirayama // *FEBS.* 2006. V. 273. P. 3346–3357.
13. Mohammad Reza, Ashrafi Kooshka, Reza Khodarahmi, Seyyed Arash Karimib, Mohammad Reza Nikbakhtc // *J. Reports in Pharmaceutical Sciences.* 2012. V. 1. № 2. P. 94–106.
14. Gorinstein Sh., Goshev I., Moncheva S., Caspi A. // *J. Protein Chem.* 2000. V. 19. № 8. P. 637–642.

15. Dumas B.T., Watsonand W.A., Biggs H.G. // Clin. Chim. Acta. 1971. V. 31. P. 87–96.
16. Syreishchikova T.I., Gryzunov Y.A., Smolina N.V., Komar A.A., Uzbekov M.G., Misionzhnik E.J., Maksimova N.M. // Laser Physics. 2010. V. 20. № 5. P. 1074–1078.
17. Szabo A.G., Rayner D.M. // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 2–4.
18. Dobretsov G.E., Syreishchikova T.I., Smolina N.V., Uzbekov M.G. // Nova Publishes. 2015. P. 129–173.
19. Smolina N.V., Syreishchikova T.I., Uzbekov M.G., Dobretsov G.E. // Eds.: Grigoriev A.I. and Vladimirov Yu.A. Moscow, MAK S Press. 2015. V. 2. P. 293–327.
20. Добрецов Г.Е., Сырейщикова Т.И., Грызунов Ю.А., Смолина Н.В., Комар А.А. // Биофизика. 2010. Т. 55. № 2. С. 213–219.
21. Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А., Сырейщикова Т.И., Смолина Н.В., Светличный В.Ю., Поляк Б.М. // Биофизика. 2012. Т. 57. № 3. С. 405–409.
22. Добрецов Г.Е., Сырейщикова Т.И., Смолина Н.В. // Биофизика. 2011. Т. 56. № 3. С. 403–406.
23. Смолина Н.В., Добрецов Г.Е., Сырейщикова Т.И., Гамбург Ю.Д., Калинина В.В., Грызунов Ю.А. // Эфферентная и физико-химическая медицина. 2012. № 3. С. 16–21.
24. Dobretsov G., Polyak B., Smolina N., Babushkina T., Syreishchikova T., Klimova T., Sverbil V., Peregudov A., Gryzunov Y., Sarkisov O. // J. Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry. 2013. V. 251. P. 134–140.

The Study of Modification of the Drug Center I of Human Serum Albumin by Sodium Hypochlorite by the Method of Time Resolved Fluorescent Spectroscopy

T. I. Syreishchikova^a, N. V. Smolina^b, M. G. Uzbekov^b,
V. V. Brilliantova^b, E. D. Syromyatnikova^a, and G. E. Dobretsov^c

^aLebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bMoscow Research Institute of Psychiatry, Branch of Serbsky Federal Medical Research Center of Psychiatry and Narcology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

^cResearch and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

The kinetics of fluorescence decay of the K-35 probe and the tryptophan amino acid residue were measured with the addition of sodium hypochlorite in the albumin fraction of a healthy donor's blood serum (HAS). The K-35 fluorescent probe (excitation 405 nm, fluorescence 530 nm) binds to the I drug center of albumin. During the experiment the molar concentration of albumin in the fraction varied from 0.3 μM to 20 μM . Oxidation of the fraction with hypochlorite was recorded by the change in the fluorescence of tryptophan, also located in the I center of albumin (excitation 290 nm, fluorescence 350 nm). It was shown that in the natural state of a person (serum albumin concentration of about 30 μM HAS retains its ability to bind ligands even after exposure to relatively large amounts of hypochlorite (up to 50 oxidizing molecules per protein molecule). The properties of the K-35 probe during oxidation remained practically unchanged, only insignificant changes in binding characteristics were recorded. The antioxidant activity of HSA allows the protein to maintain its native function in the human state. These observations prove the ability of albumin to fulfill its transport role even after the effects of progressive oxidation throughout the life of albumin.

Keywords: fluorescence probe, Trp amino acid residue, fluorescence attenuation, time resolved fluorescence method, sodium hypochlorite

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 616.858:615.214

СУБХРОНИЧЕСКОЕ ВВЕДЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НООПЕПТ И СЕМАКС УВЕЛИЧИВАЕТ ПЛОТНОСТЬ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ МЫШЕЙ BALB/c

© 2021 г. Е. В. Васильева¹, А. А. Абдуллина¹, Г. И. Ковалёв¹, *

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.01.2021 г.

После доработки 11.03.2021 г.

Принята к публикации 16.03.2021 г.

В экспериментах на инбредных мышах BALB/c и C57BL/6 изучено влияние 5-кратного внутрибрюшинного и интраназального введений ноопепта (1 мг/кг/день) и семакса (0.6 мг/кг/день), проявляющих ноотропный и анксиолитический эффекты только у мышей BALB/c, на специфическое связывание [³H]-Мусцимола с ГАМК_A-рецепторами префронтальной коры мозга в условиях *ex vivo*. Установлено, что у мышей обеих линий исходное содержание мест связывания ($B_{\max}$) и константы диссоциации (K_d) не различаются существенно. Однако в результате субхронического в/б введения Ноопепта и Семакса мышам BALB/c, отмечено достоверное возрастание плотности ГАМК_A-рецепторов на 38 и 68% относительно контрольной группы, а после назального введения – на 18 (ноопепт) и 37% (семакс), что соответствует преобладанию анксиолитического эффекта этих препаратов при внутрибрюшинном введении у мышей этой линии. В группе мышей C57BL/6 не было обнаружено значимых изменений характеристик ГАМК_A-рецепторов в префронтальной коре, кроме снижения плотности рецепторов под влиянием в/б введения ноопепта (–20%). Однонаправленное влияние ноопепта и семакса на плотность ГАМК_A-рецепторов при обоих путях введения, а также соответствие выраженности этих изменений степени проявления анксиолитического эффекта в зависимости от способа введения могут указывать на участие этих рецепторов в механизме формирования анксиолитического компонента этих пептидов.

Ключевые слова: ноопепт, семакс, BALB/c, C57BL/6, префронтальная кора, ГАМК_A-рецепторы, [³H]-Мусцимол

DOI: 10.31857/S1027813321030134

ВВЕДЕНИЕ

Вещества пептидной природы ноопепт и семакс принадлежат к клинко-фармакологической группе “Ноотропный препарат”, улучшая высшие интегративные функции мозга – память и способность к обучению. В экспериментальных условиях это выражается в препятствии развитию у животных моделируемой амнезии различного генеза (электрошок, блокада центральных холин- и глутаматергических структур, лишение парадоксальной фазы сна) [1], а также в избирательном повышении эффективности исследовательского поведения (ЭИП) в неинвазивном тесте “закрытый крестообразный лабиринт” (ЗКЛ) у мышей с исходным фенотипическим или генотипическим дефицитом когнитивной функции [2, 3]. При этом в радиорецепторных исследованиях

ex vivo показано, что этот эффект развивается лишь в результате неоднократного введения ноотропов [4, 5] и сопровождается изменениями рецепторных характеристик NMDA-рецепторов в гиппокампе и н-холинорецепторов в префронтальной коре мозга [6, 7]. Предпосылками для проведения данного исследования стали следующие экспериментальные факты: (а) инбредная линия мышей BALB/c обладает исходно повышенной тревожностью и меньшей ЭИП в сравнении с линией C57BL/6 в условиях теста ЗКЛ [8]; (б) оба пути введения семакса и ноопепта мышам BALB/c приводят к снижению тревожности и увеличению эффективности исследовательского поведения, однако первый эффект более выражен при внутрибрюшинном, а второй – при интраназальном пути введения [9]; (в) в электрофизиологических экспериментах на изолированных нейронах оба пептида усиливают ГАМК-активируемые ионные токи [10, 11]. Вместе с тем, до настоящего времени отсутствовали свидетельства о

* Адресат для корреспонденции: 125315 Москва, ул. Балтийская, 8, тел. 495-601-2051; e-mail: geo-kovalev@yandex.ru, msyb2006@yandex.ru.

непосредственном вовлечении ГАМК_A-рецепторов в механизм действия ноопепта и семакса. Обнаружилось также, что другим общим свойством обоих пептидов является зависимость спектров их психофармакологического действия от пути введения: ноотропное действие преобладает над анксиолитическим при интраназальном введении, тогда как при внутривentricularном более ярко проявляется последнее [9]. Учитывая, что в клинических условиях семакс применяется интраназально, а ноопепт перорально, а также что анксиолитический эффект связан с функцией центральных ГАМК_A-рецепторов [12, 13], целью работы стало сопоставление эффектов внутривentricularного и интраназального введений двух пептидов на специфическое связывание [³H]-Мусцимола мембранами префронтальной коры мозга мышей BALB/c и C57BL/6.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования проводили на самцах мышей линий BALB/c и C57BL/6 массой 25–30 г (питомник “Столбовая”), которых содержали в виварии ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму *ad libitum*, по 15 особей в клетке в течение 1-й недели до начала эксперимента, на стандартной диете при 12-ти часовом световом режиме. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), приказу Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”.

Животным посредством в/б и и/н (10 мкл, с использованием микропипетки фирмы Ерпендорф) инъекций в течение 5 дней (субхроническое введение) ежедневно один раз в сутки вводили физиологический раствор (контрольная группа – NaCl, 0.9%), либо препараты, растворенные в физрастворе (опытные группы). Мышей декапитировали сразу после испытания в тесте “закрытый крестообразный лабиринт”, подробно описанном ранее [9], головной мозг извлекали на льду, выделяли префронтальную кору по общепринятой схеме [14] и сохраняли при –80°C для последующего проведения радиолигандного анализа.

Вещества. В экспериментах применяли в/б и и/н пути введения Ноопепта (ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”, 1 мг/кг/день), Семакса (ОХФВ ИМГ РАН, 0.6 мг/кг/день), при которых проявляются как ноотропный, так и анксиолитический эффекты [15, 16]. Для изучения рецепторного связывания использовали [³H]-Мусцимол

(PerkinElmer). Остальные реактивы приобретены в коммерческих источниках.

Выделение плазматических мембран с ГАМК_A-рецепторами коры мозга. Приготовление мембранных препаратов, содержащих ГАМК_A-рецепторы коры мозга проводили по модифицированным методам [17, 18]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при –80°C. В день эксперимента префронтальную кору размельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон–стекло” в 20 объемах ледяного буфера (0.32 М Сахароза; pH 7.1). Гомогенат центрифугировали в ультрацентрифуге Optima L-70K (Beckman Coulter) в течение 10 мин при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл холодной дистиллированной воды и центрифугировали 8000 g 20 мин. Супернатант и желтый надосадочный слой повторно центрифугировали при 48000 g 20 мин. Осадок суспендировали в 0.05 М Tris-citrate буфере (pH 7.1) и центрифугировали 48000 g 20 мин. Полученную мембранную фракцию замораживали и хранили при –80°C. В день эксперимента мембраны суспендировали в 40 объемах 0.05 М Tris-citrate буфера (pH 7.1) и центрифугировали при 48000 g 20 мин. Полученный осадок суспендировали в 40 объемах 0.05 М Tris-citrate буфера (pH 7.1) и инкубировали при 24°C в течение 30 мин. и снова центрифугировали при 48000 g 20 мин. Конечный осадок ресуспендировали в свежем буфере.

Радиолигандный анализ ГАМК_A-рецепторов. Инкубационная смесь (конечный объем 0.5 мл) содержала 50 мкл [³H]-Мусцимола (удельная активность 30.2 Кюри/ммоль), 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда. Реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 1 ч.

Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолоконистые фильтры GF/C (Whatman), предварительно выдержанные в 0.3% полиэтиленимине в течение 2 ч при комнатной температуре. Каждую пробирку промывали два раза холодным буфером, затем фильтры промывали два раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы. Фильтры заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г РРО, 0.2 г РРОР на 1 л толуола). Радиоактивность проб определяли на счетчике Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer) с эффективностью счета 42–46%. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури (1951).

Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программу GraphPad

Таблица 1. Влияние внутрибрюшинного и интраназального субхронических введений ноопепта и семакса на плотность ГАМК_A-рецепторов мозга мышей BALB/c и C57BL/6 в условиях *ex vivo* ($m \pm S.E.M.$)

Линия мышей, путь введения		Лиганд, [³ H]-Мусцимол		
		Величина $B_{\max}$ (фмоль/мг белка) (% к контролю)		
		контроль	ноопепт	семакс
BALB/c	в/б	1125 ± 37 (100)	1547 ± 61* (+38)	1890 ± 85* (+68)
	и/н	1136 ± 49 (100)	1344 ± 50* (+18)	1561 ± 61* (+37)
C57BL/6	в/б	1249 ± 43 (100)	997 ± 36* (–20)	1341 ± 47 (+7)
	и/н	1274 ± 68 (100)	1371 ± 45 (+8)	1330 ± 56 (+4)

Примечания: * – статистически значимые отличия от контроля (*t*-тест Стьюдента, $p < 0.05$); в скобках – значения в % относительно контроля.

Prism 4 Demo и Statistica 6.0. Результаты представлены в виде “mean ± S.E.M”.

Обработка и представление результатов. В экспериментах *in vitro* величину IC₅₀ по отношению к связыванию меченых лигандов определяли при добавлении в инкубационную среду 50 мкл исследуемого соединения в конечных концентрациях в диапазоне 10^{–9}–10^{–4} М. Объем инкубационной смеси составлял 500 мкл. Результаты экспериментов по радиорецепторному связыванию *ex vivo* оценивали с помощью рассчитанных величин K_d и $B_{\max}$, которые отражают степень сродства рецептора к лиганду (нМ) и количество мест связывания лиганда (фмоль/мг белка) соответственно. Для анализа насыщения и получения характеристик связывания $B_{\max}$ и K_d , измеряли специфическое связывание для ГАМК_A-рецепторов – от 5 до 40 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Для построения кривых вытеснения и насыщения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 3-х повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании были использованы образцы ткани префронтальной коры мозга мышей BALB/c и C57BL/6, которым ранее были 5-кратно введены внутрибрюшинно и интраназально семакс и ноопепт с последующим тестированием в закрытом крестообразном лабиринте (ЗКЛ) [9].

В первой серии экспериментов было изучено влияние семакса и ноопепта на рецепторное связывание методом вытеснения специфического лиганда ГАМК_A-рецепторов [³H]-Мусцимола в

условиях *in vitro*. Ни один из пептидов не конкурировал за места связывания лиганда в диапазоне концентраций 10^{–4}–10^{–9} М, что свидетельствует об отсутствии у них структурного сродства к ортостерическим местам связывания ГАМК_A-рецептора, величины IC₅₀ составили >100 мкмоль/л.

Как было показано нами ранее на мембранах коры мозга крыс Вистар в условиях *in vitro*, семакс демонстрировал умеренную степень взаимодействия с mGluII-рецепторами (IC₅₀ = 33 ± 2 мкМ), а ноопепт – с АМПА-рецепторами глутамата с IC₅₀ = 0 ± 6 мкМ [19].

Для оценки возможности функционального вовлечения ГАМК_A-рецепторной системы в механизм фармакологического действия ноопепта и семакса в радиорецепторном анализе связывания [³H]-Мусцимола был использован метод насыщения, результаты которого представлены на рис. 1 и 2 соответственно. Во всех вариантах опытов в связывании изменений в величине константы диссоциации K_d не наблюдалось, однако наблюдались различия в величинах $B_{\max}$, характеризующих плотность мест специфического связывания [³H]-Мусцимола.

В группах контроля (0.9% NaCl) величины $B_{\max}$ не различались ни между линиями мышей, ни в зависимости от пути введения (табл. 1). Это свидетельствует о том, что используемые инбредные линии мышей не различаются по исходному ГАМК_A-рецепторному статусу.

Однако, пятикратное в/б введение ноопепта в дозе 1 мг/кг мышам BALB/c сопровождалось возрастанием $B_{\max}$ с 1125 ± 37 фмоль/мг белка в контроле (физраствор) до 1547 ± 61 фмоль/мг белка ($p < 0.05$, *t*-тест). И/н путь введения приводил к

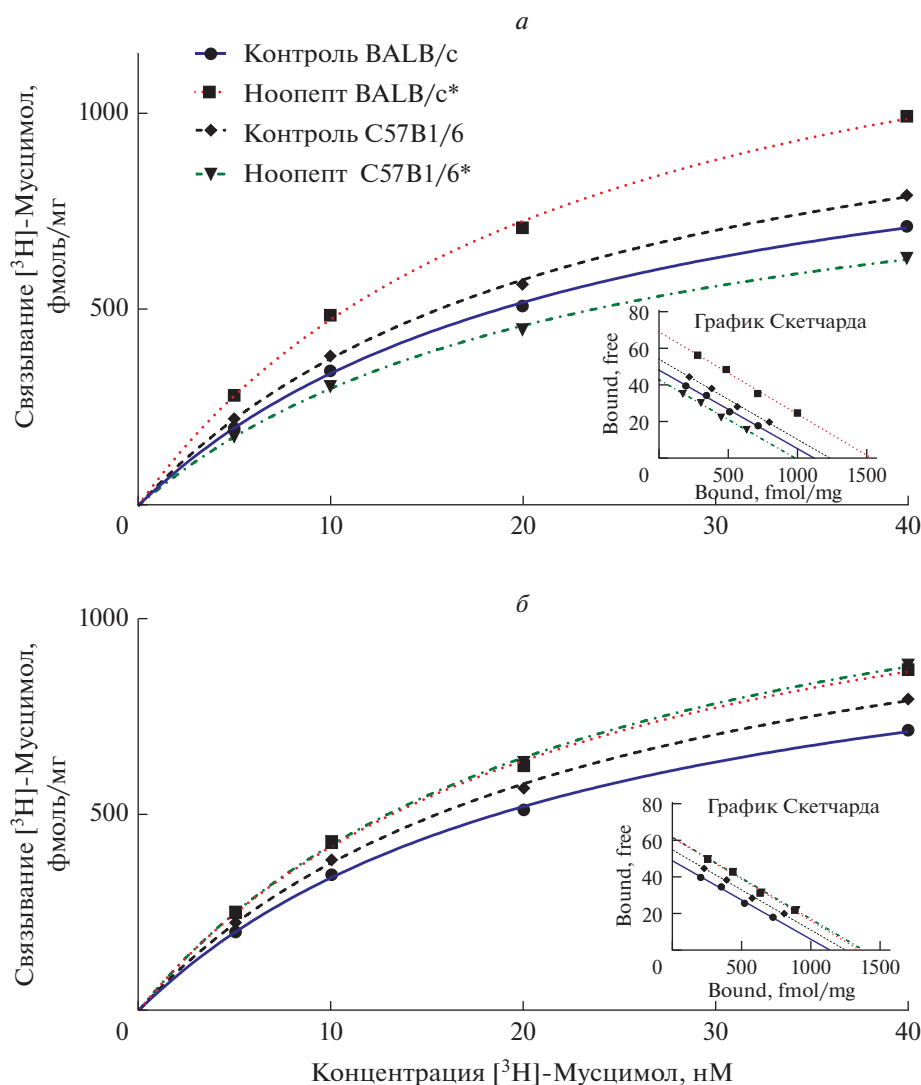


Рис. 1. Влияние внутрибрюшинного (а) и интраназального (б) введения ноопепта на связывание специфического лиганда с ГАМК_A-рецепторами коры мозга мышей BALB/c и C57BL/6, кривые насыщения и график Скетчарда. Примечание: * — статистически значимые отличия от контроля по *t*-тесту Стьюдента, $p < 0.05$.

увеличению плотности рецепторов с 1136 ± 49 фмоль/мг белка до 1344 ± 50 ($p < 0.05$, *t*-тест). В группе сравнения (мыши C57BL/6) при в/б введении происходило снижение $B_{\max}$ со 1249 ± 43 фмоль/мг белка в контроле до 997 ± 36 фмоль/мг белка ($p < 0.05$, *t*-тест), а и/н введение показало себя неэффективным: 1371 ± 45 фмоль/мг белка против 1274 ± 68 фмоль/мг белка в контроле ($p > 0.05$, *t*-тест) (рис. 1, табл. 1).

Субхроническое введение семакса (0.6 мг/кг/день) мышам BALB/c приводило к увеличению $B_{\max}$ до 1890 ± 85 фмоль/мг белка после в/б введения ($p < 0.05$, *t*-тест) и до 1561 ± 61 фмоль/мг белка после и/н введения ($p < 0.05$, *t*-тест). У мышей C57BL/6 значимых изменений $B_{\max}$ не отмечено ни при одном из путей введения (рис. 2, табл. 1).

Таким образом, существенное увеличение плотности ГАМК_A-рецепторов наблюдается у мышей BALB/c как под влиянием ноопепта, так и семакса. При этом у обоих пептидов эффект более выражен при внутрибрюшинном (+38 и +68% относительно контроля соответственно), чем при интраназальном пути введения (+18 и +37% соответственно).

В недавно опубликованных результатах о поведении этих мышей в тесте ЗКЛ [9] было показано, что у мышей BALB/c, исходно характеризующихся меньшей эффективностью исследовательского поведения и большей тревожностью, ноопепт и семакс вызывают как улучшение исследовательского поведения, так и снижение тревожности. Причем, показатели эффективности обследования лабиринта (ноотропный эффект) были выше при ин-

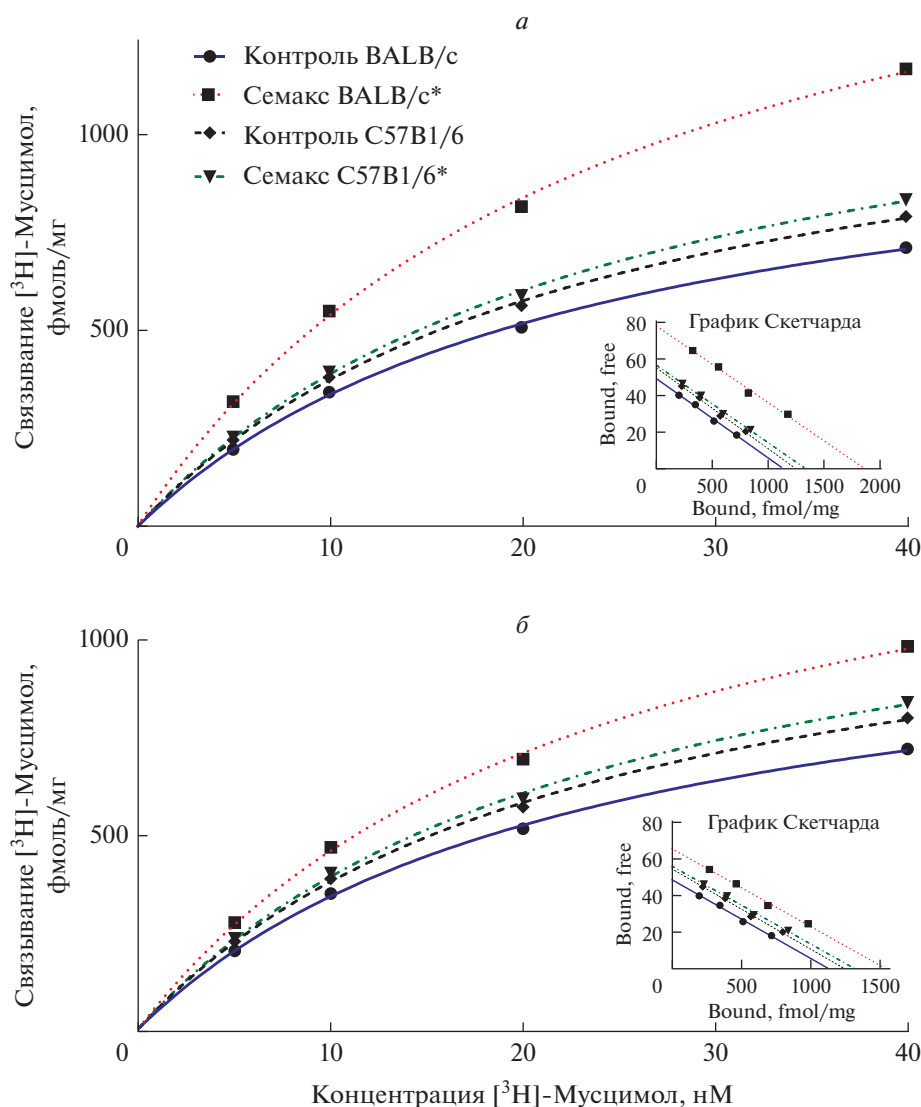


Рис. 2. Влияние внутрибрюшинного (а) и интраназального (б) введения семакса на связывание специфического лиганда с ГАМК_A-рецепторами коры мозга мышей BALB/c и C57BL/6, кривые насыщения и график Скэтчарда. Примечание: * — статистически значимые отличия от контроля по *t*-тесту Стьюдента, $p < 0.05$.

траназальном пути введения (+29 и +36% соответственно), чем при внутрибрюшинном (+2 и +16%). Наоборот, анксиолитическая активность (уменьшение латентного времени первого захода в боковой отсек) была выражена ярче после внутрибрюшинного введения: +57 и +53% относительно контроля соответственно. У мышей линии сравнения C57BL/6 плотность мест специфического связывания практически не изменялась, снижаясь на 20% лишь при в/б введении ноопепта (табл. 1).

Таким образом, при сопоставлении результатов поведенческих и радиорецепторных исследований можно сделать предположение, что анксиолитический (противотревожный) компонент действия ноопепта и семакса сопровождается возрастанием количества ГАМК_A-рецепторов в префронтальной коре мозга мышей BALB/c. Причем

присутствует количественное соответствие анксиолитического эффекта и увеличения ГАМК_A-рецепторов в зависимости от способа введения (в большей степени выражено при в/б введении). Действительно, в ряде фармакологических, фармакогенетических и электрофизиологических экспериментов показано, что ГАМК-рецепторный комплекс вовлечен в процесс регуляции эмоционального состояния [13, 20, 21].

Ранее было показано, что облегчение ГАМК-ергической нейротрансмиссии обеспечивает анксиолитический эффект, а ее ослабление ведет к нарастанию тревожности. В частности, с помощью генетических и фармакологических подходов установлено, что если положительная модуляция альфа2-содержащих ГАМК-рецепторов у мышей дикого типа дает бензодиазепин-индуцированный

анксиолиз, то отрицательная модуляция, или нокаут этого подтипа рецепторов, может привести к противоположным поведенческим эффектам, например, повышенной тревожности [22]. В этом смысле полученные нами результаты комбинированного применения фармакологического и радиорецепторного подходов на инбредных мышах подтверждают функциональное участие ГАМК_A-рецепторов префронтальной коры мозга в механизме анксиолитического компонента действия пептидных препаратов ноопепт и семакс.

ВЫВОДЫ

1. Пептидные препараты ноопепт и семакс не конкурируют за специфические места связывания агониста ГАМК_A-рецепторов [³H]-Мусцимола в условиях *in vitro*.

2. После субхронического внутрибрюшинного и интраназального введения пептидов инбредным мышам BALB/c и C57BL/6 плотность мест специфического связывания [³H]-Мусцимола ($B_{\max}$) на мембранах префронтальной коры мозга возрастает только у первых.

3. Увеличение величины $B_{\max}$ в результате внутрибрюшинного введения обоих пептидов мышам BALB/c вдвое превосходит таковое после интраназального, что соответствует преобладанию анксиолитического эффекта этих препаратов при внутрибрюшинном введении.

4. Полученные результаты могут говорить о функциональном участии ГАМК_A-рецепторов префронтальной коры мозга в механизме анксиолитического компонента действия пептидных препаратов ноопепт и семакс.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0521-2019-0009 “Анализ рецепторных механизмов и поиск средств фармакологической протекции ЦНС при нарушениях мозгового кровообращения и когнитивных расстройствах”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Организация экспериментов соответствовала этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург; Правила надлежащей лабораторной практики”, утвержденные приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016.). Проведение экспериментов одобрено

Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронов А.Н. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
2. Ковалев Г.И., Фирстова Ю.Ю., Салимов Р.М., Кондрахин Е.А. // Психиатрия. 2010. Т. 45. № 3. С. 23–27.
3. Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. // Эксперим. и клин. фармакол. 2012. Т. 75. № 7. С. 32–37.
4. Ковалёв Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г. // Эксперим. и клин. фармакол. 2013. Т. 76. № 9. С. 3–10.
5. Ковалёв Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г. // Эксперим. и клин. фармакол. 2014. Т. 77. № 12. С. 49–55.
6. Ковалев Г.И., Фирстова Ю.Ю., Салимов Р.М. // Эксперим. и клин. фармакол. 2007. Т. 71. № 12. С. 12–17.
7. Ковалёв Г.И., Фирстова Ю.Ю. // Клин. фармакол. тер. 2010. Т. 19. № 6. С. 72–73.
8. Ковалёв Г.И., Васильева Е.В., Салимов Р.М. // Журн. ВНД. 2019. Т. 69. № 1. С. 123–130.
9. Vasileva E.V., Kondrakhin E.A., Abdullina A.A., Salimov R.M., Kovalev G.I. // Neurochem. J. 2020. V. 14. № 3. P. 268–278.
10. Kondratenko R.V., Derevyagin V.I., Skrebitsky V.G. // Neurisci. Lett. 2010. V. 476. P. 70–73.
11. Sharonova I.N., Bukanova Yu.V., Myasoedov N.F., Skrebitskii V.G. // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. V. 164. № 5. P. 612–616.
12. Haefely W., Kulcsár A., Möhler H. // Psychopharmacol. Bull. 1975. V. 11. P. 58–59.
13. Smith K.S., Engin E., Meloni E.G., Rudolph U. // Neuropsychopharmacology. 2012. V. 63. P. 250–258.
14. Glowinski L.L., Iversen J. // J. Neurochem. 1966. V. 13. № 8. P. 655–669.
15. Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. // Эксперим. и клин. фармакол. 2016. Т. 79. № 9. С. 3–11.
16. Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016. № 2. С. 31–36.
17. Ito Y., Lim D.K., Hayase Y., Murakoshi Y., Ho I.K. // Neurochemical Research. 1992. V. 17. № 4. P. 307–313.
18. Hawkinson J., Acosta-Burrue M., Kimbrough C.L., Goodnough D.B., Wood P.L. // Eur. J. Pharmacol. 1996. V. 304. № 1–3. P. 141–146.
19. Фирстова Ю.Ю., Васильева Е.В., Ковалёв Г.И. // Эксперим. и клин. фармакол. 2010. Т. 74. № 1. С. 6–10.
20. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г., Бледнов Ю.А., Бадыштов Б.А., Виглинская И.В., Козловская М.М., Колотилинская Н.В., Яркова М.А., Савелев В.Л., Гарибова Т.Л., Вальдман Е.А. // Вестн. РАМН. 1998. Т. 11. С. 3–9.
21. Воронина Т.А., Середенин С.Б. // Эксперим. и клин. фармакол. 2002. Т. 65. № 5. С. 4–17.
22. Rudolph U., Mohler H. // ARPTDI. 2004. V. 44. P. 475–498.

The Sub-Chronic Administration of Noopept and Semax Peptides Increases the Density of Cortical GABA_A-receptors in BALB/c Mice

E. V. Vasileva^a, A. A. Abdullina^a, and G. I. Kovalev^a

^a*Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

The effect of noopept (1 mg/kg/day) and semax (0.6 mg/kg/day) on the *ex vivo* [³H]-muscimol binding to GABA_A-receptors in the PFC of inbred BALB/c and C57BL/6 mice were examined after subchronic intraperitoneal (i.p.) and intranasal (i.n.) administration known to produce nootropic and anxiolytic activity in BALB/c, but not in C57BL/6 mice. It was found that the number of binding sites ($B_{\max}$) at baseline and dissociation constants (K_d) for GABA_A receptor do not differ significantly between the two strains. In BALB/c mice i.p. noopept and semax administration increased GABA_A-receptor density by 38 and 68% compared to control group, and after i.n. administration – by 18 and 37% respectively, which correspond to more pronounced anxiolytic effect of the peptides after intraperitoneal administration compared to intranasal route. But none of the drugs provides significant effect on GABA_A-receptors in C57BL/6 mice brain, except for noopept, which decreased the $B_{\max}$ value by 20% after i.p. administration. The similarity of noopept and semax effects on GABA_A-receptor density for both administration routes as well as the accordance of the degree of $B_{\max}$ alterations with intensity of anxiolytic effects depending on administration route may indicate an involvement of GABA_A-receptors in the mechanisms underlying the anxiolytic effects of these peptides.

Keywords: *noopept, semax, mice, BALB/c, C57BL/6, prefrontal cortex, GABA_A-receptor, [³H]-muscimol*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 612.821+612.826

ОКСИД АЗОТА ТОРМОЗИТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВАЦИЮ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СТРАХА И УМЕНЬШАЕТ ЕГО ГЕНЕРАЛИЗАЦИЮ

© 2021 г. Н. Б. Саульская¹ *, М. А. Бурмакина¹, Н. А. Трофимова¹

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

Поступила в редакцию 01.02.2021 г.

После доработки 03.02.2021 г.

Принята к публикации 04.02.2021 г.

Ранее мы показали, что выработка условной реакции страха (модель формирования страха) сопровождается подъемом уровня внеклеточного серотонина в медиальной префронтальной коре, усиливающим будущую генерализацию страха. Цель работы — исследовать возможный вклад в такую регуляцию NO-серотонинового взаимодействия. На крысах линии Спрег-Доули методом прижизненного внутримозгового микродиализа показано, что введение в медиальную префронтальную кору методом диализной инфузии донора NO диэтиламин наноата (1 мМ) увеличивает уровень внеклеточного серотонина в этой области в первые 30 мин введения с последующим постепенным снижением этого показателя. Такое введение предотвращает подъем уровня внеклеточного серотонина в медиальной префронтальной коре, вызываемый выработкой условной реакции страха (сочетание условного звукового сигнала (CS+) с неизбежным болевым раздражением), и приводит через сутки к уменьшению замиранья животных на дифференцировочный звуковой сигнал (CS–), не ассоциируемый с болевым раздражением (показатель генерализованного страха), не влияя на замирание тех же животных на условный сигнал (CS+), ранее сочетавшийся с болевым раздражением (показатель условнорефлекторного страха). Полученные данные впервые свидетельствуют, что при формировании условной реакции страха нитергические сигналы в медиальной префронтальной коре тормозят функциональную активацию серотониновой системы, уменьшая ее вклад в формирование генерализованного страха.

Ключевые слова: медиальная префронтальная кора, внутримозговой микродиализ, выброс серотонина, оксид азота, NO-серотониновое взаимодействие, условная реакция страха, генерализация страха

DOI: 10.31857/S1027813321030110

ВВЕДЕНИЕ

Медиальная префронтальная кора (мПК) рассматривается в литературе в качестве центрального звена адаптивного контроля страха [см. 1–3], регулирующего его неоправданные проявления. Нарушение такого контроля при инактивации мПК или ее выходных путей в экспериментальных моделях страха на животных [4, 5], а также у пациентов с посттравматическим стрессовым расстройством [6] выражается, в частности, в усилении проявлений страха на безопасные стимулы (генерализация страха). Данные литературы свидетельствуют, что регуляция этой корковой областью генерализации страха связана с формированием и/или консолидацией дифференцировочной памяти и зависит от активации НМДА рецепторов на пирамидных нейронах мПК [7, 8].

Активность этих нейронов находится под контролем нескольких нейромодуляторных систем. Ранее мы показали, что две из них, серотонинергическая и нитергическая, задействованы в контроле генерализации страха, причем оказывают на нее противоположные по знаку влияния [9–12]. В частности, по нашим данным, полученным в микродиализных экспериментах, обе эти системы мПК усиливают свою активность при выработке условной реакции страха (УРС — сочетание условных звуковых сигналов CS+ с неизбежным болевым раздражением) [10, 12]. Причем степень такой активации у конкретного животного влияет на степень последующей генерализации страха: чем сильнее активирована серотониновая система мПК во время выработки УРС [9] или чем меньше активирована ее нитергическая система [12], тем сильнее будут впоследствии проявления генерализованного страха (замирание на безопасные дифференцировочные стимулы). Одна-

* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6; тел.: (812) 323-07-79 (доб. 116); e-mail: saulskeyanb@infran.ru.

ко не известно, насколько независимы такие изменения активностей названных систем мПК во время выработки УРС, не исследовано, может ли нитергическая система мПК в ходе формирования страха влиять на активность серотониновой системы мПК, изменяя тем самым ее вклад в генерализацию страха.

С использованием различных методических подходов продемонстрировано, что NO регулирует синтез, высвобождение и обратный захват серотонина в ряде отделов ЦНС [см. 13, 14]. Показано участие NO-серотонинового взаимодействия в контроле тревожности [15], депрессивного поведения [14] и агрессивности [16]. Однако сведения о роли NO-серотониновых влияний в генерализации страха ограничены. А именно, установлено, что мыши с генным нокаутом нейронной NO синтазы, с одной стороны, характеризуются повышенной генерализацией страха [17], а с другой стороны, демонстрируют сниженный метаболизмом серотонина и увеличение его тканевого уровня в ряде областей мозга, включая кору [16]. Сопоставления этих данных, полученных в разных исследованиях, позволяет предполагать, что чрезмерная генерализация страха у животных с генным нокаутом нейронной NO синтазы может быть опосредована хотя бы частично дисфункцией серотониновой системы ЦНС, вызываемой недостатком NO. Вместе с тем, сведения о роли локальных NO-зависимых серотониновых механизмов мПК в регуляции генерализации страха отсутствуют.

Цель настоящей работы заключалась в изучении возможного вклада NO-серотонинового взаимодействия в мПК в регуляцию этой корковой областью генерализации страха. Для этого, методом прижизненного внутримозгового микродиализа, во-первых, исследованы эффекты введения в мПК донора NO диэтиламин ноноата (1 мМ) на изменения уровня внеклеточного серотонина в этой области, вызываемые выработкой УРС, во-вторых, изучено влияние такого введения, осуществляемого во время выработки УРС, на формирование и генерализацию этой условнорефлекторной реакции, оцениваемых по замиранию животных (показатель страха) при предъявлении условных сигналов (CS+), ранее сочетавшихся с болевым раздражением, и дифференцировочных сигналов (CS–), не ассоциируемых с болевым раздражением соответственно. Таких сведений в литературе нет.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах-самцах линии Спрег-Доули массой 270–350 г из биокolleкции “Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Эксперименты проводили в соответствии с международными нормами гуманного обращения с

экспериментальными животными (директива Евросоюза № 86/609/ЕЕС). Крысам под наркозом (рометар, 1.4 мкг/100 г массы и золетил, 5 мг/100 г массы, внутримышечно) имплантировали диализные канюли в мПК, как описано ранее [12]. Эксперименты с применением микродиализа проводили на второй и третий день после имплантации канюль. Животных разделяли на 2 группы: группа “Без введения” ($n = 10$) и группа “DEA NONO” ($n = 9$). Схема эксперимента приведена на рис. 1. В первый экспериментальный день (этап обучения) крыс обеих групп тестировали в течение 10 мин в установке “Открытое поле” для выяснения исходного уровня подвижности животных перед обучением. Регистрировали горизонтальную активность (пересечения границ секторов установки) и количество стоек. Затем каждое животное помещали в дневную домашнюю клетку и начинали перфузию мПК искусственной спинномозговой жидкостью (ИСМЖ) со скоростью 1 мкл/мин, используя диализный насос SP-300 (Next Advanced, США). После периода стабилизации (1.5 ч) собирали 5 фоновых порций диализата (по 15 мин каждая). Далее у крыс группы “Без введения” вырабатывали УРС с дискриминационным компонентом, как ранее описано [9]. Коротко, крысу сначала помещали в условнорефлекторную камеру с решетчатым полом на 5 мин, где с интервалом в 1 мин ей предъявляли условный стимул (CS+) – тон (1000 Гц, 10 с), сочетаемый на последней секунде с электрокожным раздражением лап (0.5 мА, 1 с) (выработка УРС). Далее животное возвращали в дневную домашнюю клетку и через 70 мин проводили дифференцировочную сессию 1 – крысу помещали в дифференцировочную камеру на 5 мин, где 1 раз в минуту предъявляли дифференцировочный сигнал (CS–) – прерывистый тон (1000 Гц, 10 с), без электрокожного раздражения. На этом этапе обучения заканчивали. Затем животное возвращали в дневную домашнюю клетку на 55 мин, после чего эксперимент завершали.

Животным группы “DEA NONO” после сбора фоновых порций диализата в ИСМЖ для перфузии мПК добавляли донор NO – диэтиламин ноноат (DEA NONO, 1 мМ; Sigma, США) и собирали 3 порции диализата. Затем у крыс этой группы сначала вырабатывали УРС, а спустя 70 мин проводили дифференцировочную сессию 1, как описано для группы “Без введения”. Через 55 мин после ее окончания перфузионную жидкость, содержащую DEA NONO, заменяли на ИСМЖ и в течение 30 мин производили дополнительную перфузию мПК для устранения остатков препарата. На этом эксперимент завершали.

На следующий день (экспериментальный день 2, этап тестирования) животных обеих групп тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте, как ранее описано [10]. Регистрировали время

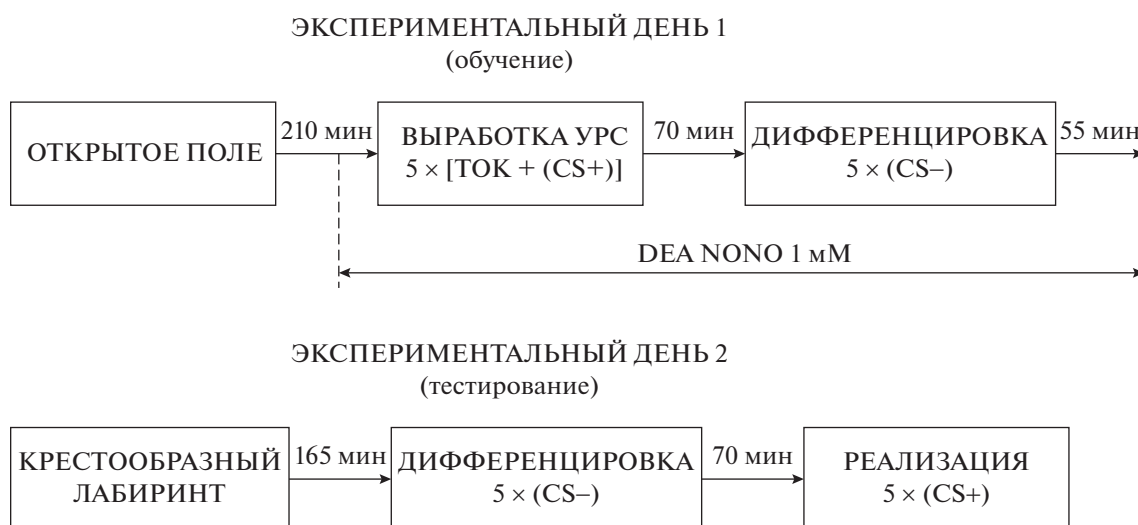


Рис. 1. Схема эксперимента. CS+ — условный звуковой сигнал; CS— — дифференцировочный звуковой сигнал.

пребывания (с) и амбуляцию (пересечения секторов) в открытых и закрытых рукавах, количество стоек в закрытых рукавах и количество свешиваний в открытых рукавах. После этого крысу пересаживали в дневную домашнюю клетку и начинали диализную перфузию мПК. После стабилизационного периода собирали 5 фоновых порций диализата. Затем с животными обеих групп сначала проводили дифференцировочную сессию 2 (тест на генерализацию УРС), как и в первый день эксперимента, а через 70 мин после нее — реализацию УРС (тест на выработанность УРС). В ходе реализации УРС крысу помещали в условнорефлекторную камеру на 5 мин, где 1 раз в минуту предъявляли CS+ (10 с) без электрокожного раздражения. Далее животное возвращали в дневную домашнюю клетку на 70 мин, после чего эксперимент завершали.

На протяжении всего периода экспериментов диализат собирали каждые 15 мин и анализировали на содержание серотонина. Поведенческие тесты сопровождалась видеорегистрацией поведения на персональном компьютере (веб-камера “Logitech”, Китай). Во время дифференцировочной сессии 2 и реализации УРС (этап тестирования) регистрировали длительность замирания (с) на условный (CS+) и дифференцировочный (CS—) сигналы — параметры, характеризующие степень выработанности УРС и степень ее генерализации соответственно, а также длительность замирания в межсигнальных интервалах (с). Для каждой крысы вычисляли коэффициент генерализации УРС — процентное отношение длительности замирания на CS— к длительности замирания на CS+.

В отдельных экспериментах у крыс ($n = 13$) с имплантированными в мПК диализными канюлями исследовали эффекты введения в мПК DEA NONO (1 mM) на чувствительность к электро-

кожному раздражению. Части животных ($n = 7$) в мПК в течение 45 мин водили 1 mM DEA NONO, добавляя препарат в перфузионную жидкость. Оставшимся животным ($n = 6$) состав перфузионной жидкости не меняли. Затем каждую крысу помещали в камеру с решетчатым покрытием пола и определяли пороги чувствительности к току (мкА), как ранее описано [10].

Уровень серотонина в диализате мПК определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (Shimadzu, Германия), как ранее описано [10]. Регистрацию и обработку хроматограмм осуществляли с помощью программы МультиХром 1.72 (Амперсент, Россия). Содержание серотонина в каждой диализной пробе выражали в нМ/л, а затем — в процентах по отношению к собственному среднему фоновому уровню. После завершения экспериментов производили забой животных (рометар, 1.4 мг/100 г массы, золетил, 5 мг/100 г массы, внутримышечно, уретан, 0.2 г/100 г массы, внутрибрюшинно). Мозг извлекали для проведения морфологического контроля попаданий. В обработку были включены крысы с локализацией канюли в мПК.

Статистическую обработку проводили с использованием статистического пакета SigmaStat (3.0). Данные выражали как среднее $\pm$ ошибка среднего (n), где n — количество животных. Сравнение изменений уровня внеклеточного серотонина относительно фона осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа (фактор — время; F -критерий). Затем проводили сравнение изменений в отдельных временных точках относительно фона по t -критерию Бонферрони (post hoc test). Межгрупповое сравнение осуществляли методом двухфакторного дисперсионного анализа (первый фактор — группа, второй фактор — время, F -критерий) с последующим срав-

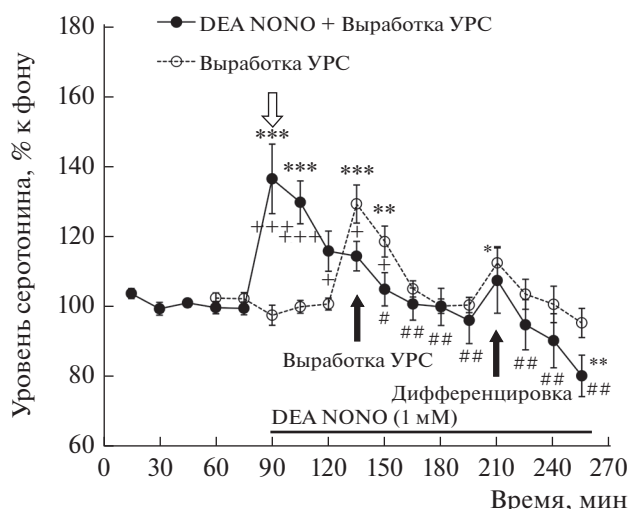


Рис. 2. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС и дифференцировочной сессии 1 (этап обучения) у животных с введением в мПК 1 мМ DEA NONO (“DEA NONO + Выработка УРС”) и у крыс без введения этого препарата (“Выработка УРС”). Разброс на графиках — ошибка среднего; белая стрелка — начало введения DEA NONO; черные стрелки — начало тестов; горизонтальная линия — период введения DEA NONO. * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.05$; *** — $p < 0.001$ — при сравнении с фоном; + — $p < 0.05$; +++ — $p < 0.001$ — при межгрупповом сравнении. # — $p < 0.05$; ## — $p < 0.001$ — при сравнении с уровнем серотонина непосредственно перед тестом “Выработка УРС” у животных группы “DEA NONO”.

нением групп в конкретных временных точках по t -критерию Бонферрони. Сравнение параметров поведения проводили при помощи t -критерия Стьюдента. Коэффициент корреляции вычисляли по методу Пирсона (SigmaStat (3.0)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Животные экспериментальных групп не различались перед началом экспериментов по активности в тесте “Открытое поле”. Горизонтальная активность: группа “DEA NONO” — 52 ± 13 (9) пересечения; группа “Без введения” — 52 ± 12 (10) пересечения; ($t = 0.05$; $p = 0.97$). Стойки: группа “DEA NONO” — 10 ± 2 (9), группа “Без введения” — 6 ± 1 (9); ($t = 1.6$; $p = 0.13$).

Фоновый уровень внеклеточного серотонина в диализате мПК составлял у животных группы “DEA NONO” 0.20 ± 0.02 (9) нМ в первый день и 0.18 ± 0.02 (9) нМ во второй день экспериментов, а у крыс группы “Без введения” — 0.19 ± 0.01 (10) нМ в первый день и 0.18 ± 0.01 (10) нМ во второй день экспериментов. Не было выявлено влияния группы ($F_{(1,34)} = 0.06$, $p = 0.8$), дня эксперимента ($F_{(1,34)} = 1.02$, $p = 0.3$) и взаимодействия этих факторов ($F_{(1,34)} = 0.10$, $p = 0.8$) на данный показатель.

Выработка УРС с дискриминационным компонентом (этап обучения) у животных группы

“Без введения” сопровождалась подъемом уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно фонового уровня перед тестированием (рис. 2; $F_{(13,117)} = 8.2$, $p < 0.001$) в ходе обоих тестов — выработки УРС (максимум $129 \pm 5\%$, длительность 30 мин) и дифференцировочной сессии 1 (максимум $112 \pm 5\%$, длительность 15 мин), что соответствует ранее полученным нами данным [10].

Введение в мПК перед выработкой УРС 1 мМ DEA NONO вызывало временный (30 мин) подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК (максимум $136 \pm 10\%$) относительно фона перед введением (рис. 2; $F_{(7,56)} = 10.7$, $p < 0.001$). Затем уровень внеклеточного серотонина мПК постепенно снижался (рис. 2; $F_{(11,88)} = 9.2$, $p < 0.001$) и в конце первого дня экспериментов становился ниже фоновых значений ($80 \pm 6\%$; $t = 3.9$; $p < 0.01$). Корреляционный анализ, охватывающий весь период введения препарата, подтвердил отрицательную корреляционную зависимость между уровнем внеклеточного серотонина в мПК и временем от начала введения DEA NONO в эту область ($r = -0.58$; $p < 0.001$).

Выработка УРС у животных группы “DEA NONO”, осуществляемая на фоне введения в мПК 1 мМ DEA NONO, не вызывала изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно этого показателя непосредственно перед тестом (рис. 2; $t = 0.19$; $p = 1.00$, t -критерий Бонферрони), а также по сравнению с фоновым уровнем серотонина перед введением препарата ($t = 2.1$; $p = 1.00$). Дифференцировочная сессия 1 у животных с введениями 1 мМ DEA NONO тоже не приводила к достоверным изменениям уровня серотонина в мПК относительно этого показателя перед тестом (рис. 2; $t = 2.0$; $p = 1.00$) и перед введением DEA NONO (рис. 1; $t = 1.7$; $p = 1.00$).

По данным двухфакторного дисперсионного анализа, изменения уровня внеклеточного серотонина во время выработки УРС у животных группы “DEA NONO” были ниже, чем этот показатель крыс группы “Без введения” (рис. 2; $F_{(13,238)} = 5.8$, $p < 0.001$).

В целом, эти данные показывают, что введение 1 мМ DEA NONO в мПК в ходе обучения предотвращает подъем уровня внеклеточного серотонина в этой области, вызываемый выработкой УРС.

Тестирование животных обеих групп в крестообразном лабиринте, проводимое на следующий день после выработки УРС показало, что крысы группы “DEA NONO”, подвергавшиеся накануне введению в мПК 1 мМ DEA NONO, не отличаются от крыс группы “Без введения” по времени пребывания в закрытых и открытых рукавах лабиринта (рис. 3а), а также по амбулации (рис. 3б) и вертикальной активности (рис. 3в) в закрытых рукавах. Однако крысы группы “DEA NONO” демонстрировали большую горизонтальную и вер-

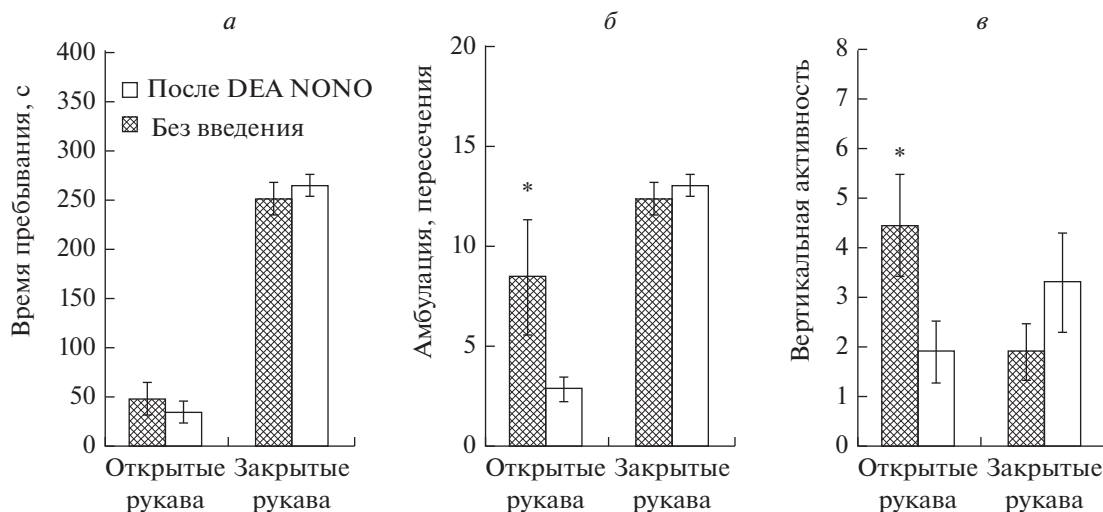


Рис. 3. а — время пребывания (с), б — амбуляция (пересечения), в — вертикальная активность (свешивания/стойки) в открытых и закрытых рукавах крестообразного лабиринта животных, подвергавшихся (“После DEA NONO”) и не подвергавшихся (“Без введения”) во время выработки УРС введению в мПК 1 мМ DEA NONO. * — $p < 0.05$ — при сравнении с этим показателем у животных группы “Без введения”.

тикальную исследовательскую активность в открытых рукавах лабиринта (рис. 3б, в).

Предъявление животным группы “Без введения” на этапе тестирования (второй день экспериментов) безопасных дифференцировочных сигналов (CS–) в ходе дифференцировочной сессии 2 и потенциально опасных условных сигналов (CS+) во время реализации УРС сопровождалось подъемом уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе обоих тестов (рис. 4, $F_{(14,112)} = 5.7, p < 0.001$), что соответствует ранее полученным нами данным [18].

Животные группы “DEA NONO”, подвергнутые во время выработки УРС (первый день экспериментов) введению в мПК 1 мМ DEA NONO, демонстрировали на следующий день (этап тестирования) рост уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе дифференцировочной сессии 2 и реализации УРС (рис. 4, $F_{(14,126)} = 9.0, p < 0.001$). Причем выраженность таких изменений у животных группы “DEA NONO” не отличалась, по данным двухфакторного дисперсионного анализа, от изменений этого показателя крыс группы “Без введения” в ходе соответствующих тестов (рис. 4, $F_{(14,126)} = 0.96, p = 0.49$).

Анализ поведения животных на этапе тестирования показал, что крысы группы “DEA NONO” характеризуются меньшей длительностью замирания на безопасный дифференцировочный сигнал (CS–) (рис. 5а; $t = 2.6; p = 0.02$), меньшим временем неподвижности в межсигнальных интервалах (рис. 5б; $t = 2.2; p = 0.04$) в ходе дифференцировочной сессии 2, а также меньшим коэффициентом генерализации УРС (рис. 5в; $t = 3.4; p = 0.003$) по сравнению с крысами группы “Без введения”. Однако животные групп “DEA NONO” и “Без

введения” не различались по уровню замирания на потенциально опасный условный сигнал (CS+) (рис. 5а; $t = 0.008; p = 0.99$) и по уровню неподвижности в межсигнальных интервалах (рис. 5б; $t = 0.078; p = 0.94$) в ходе реализации УРС.

Порог чувствительности к электрокожному раздражению крыс с введением в мПК в течение 45 мин 1 мМ DEA NONO составил 186 ± 9 мкА (7), что не отличалось значимо от величины этого показателя у животных без введения препарата (170 ± 10 мкА (6); $t = 1.1; p = 0.28$).

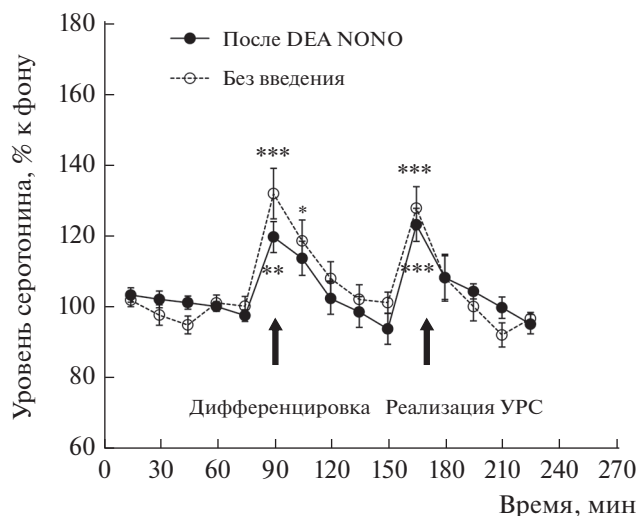


Рис. 4. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе дифференцировочной сессии и реализации УРС (этап тестирования) у животных, подвергавшихся (“После DEA NONO”) и не подвергавшихся (“Без введения”) во время выработки УРС введению в мПК 1 мМ DEA NONO. Остальные обозначения, как на рис. 2.

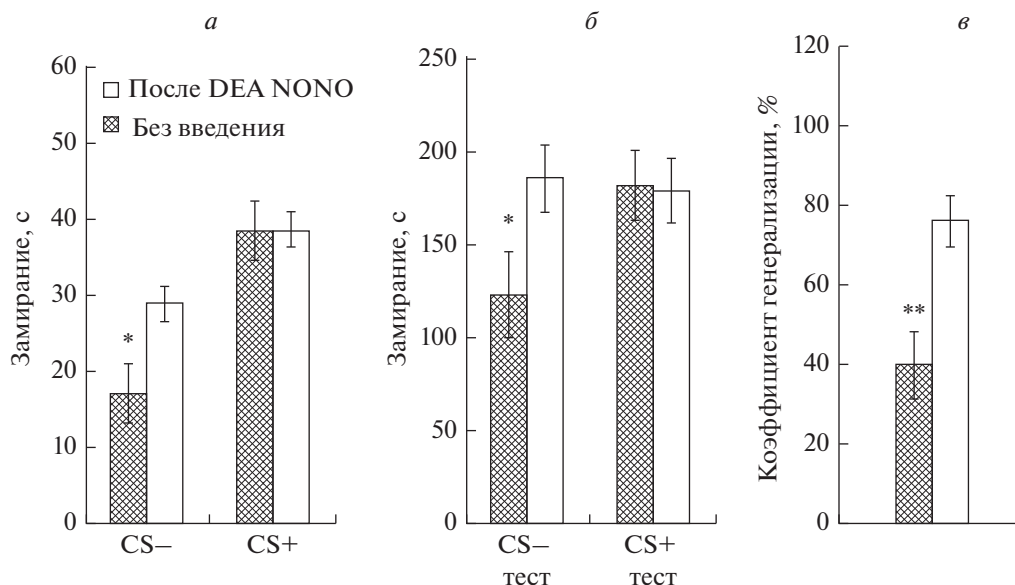


Рис. 5. *а* – время заморозки на дифференцировочный (CS–) и условный (CS+) сигналы, *б* – время неподвижности (с) в межсигнальных интервалах во время дифференцировочной сессии (CS– тест) и реализации УРС (CS+ тест), *в* – коэффициент генерализации УРС (%) у животных, подвергавшихся (“После DEA NONO”) и не подвергавшихся (“Без введения”) во время выработки УРС введению в мПК 1 мМ DEA NONO. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ – при сравнении с этим показателем крыс группы “Без введения”.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные литературы свидетельствуют, что системные введения ингибиторов NO синтазы увеличивают тканевый уровень и уменьшают метаболизм серотонина в ряде отделов ЦНС, включая фронтальную кору [19] (но см. [20]). К таким же эффектам приводит генный нокаут нейронной NO синтазы [16], о чем упоминалось во введении. Более того, по данным микродиализных экспериментов, введения в дорсальное ядро шва донора NO *S*-нитрозо-*N*-пенициллина (SNAP, 5 мМ) и ингибитора нейронной NO синтазы 7-нитроиндазола (1 мМ) оказывают соответственно активационные и тормозные влияния на высвобождение серотонина во фронтальной коре [21]. Все это говорит об участии нитергической системы ЦНС в контроле активности коркового звена серотониновой системы. Вместе с тем не известно, происходит ли такое NO-серотониновое взаимодействие в самой коре или же его эффекты на корковом уровне опосредованы другими структурами мозга, например, ядрами шва, о чем свидетельствуют данные, процитированные выше [21]. Не исследовано, воздействуют ли локальные нитергические сигналы на высвобождение серотонина в мПК, хотя морфологические предпосылки такого взаимодействия существуют. В частности, показано, что в серотониновых волокнах, иннервирующих мПК, нейронная NO-синтаза колокализована с белками транспортеров серотонина [22], активность которых является важным регулятором пула внеклеточного серотонина и доступности серотонина для его рецепторов.

Значимым результатом работы явилось то, что в ней показаны влияния активации нитергической системы мПК на активность ее серотониновой системы. А именно, продемонстрировано, что введения в мПК донора NO DEA NONO (1 мМ) увеличивает фоновый уровень внеклеточного серотонина в мПК в первые 30 мин введения с последующим угасанием такого активационного эффекта и перерастанием его в тормозной (снижение уровня внеклеточного серотонина в мПК в конце введения препарата). Следует подчеркнуть, что в литературе продемонстрированы как тормозные, так и активационные эффекты NO на высвобождение серотонина в зависимости от области мозга или концентрации NO, создаваемой NO донорами, что связывают с множественностью мишеней NO. В частности, в экспериментах, использующих push-pull канюльную соперефузию мозга, установлены активационные влияния введения в гипоталамус в течение 10 мин 0.4 мМ DEA NONO и других NO доноров на уровень внеклеточного серотонина в этой структуре, но тормозные эффекты таких введений при концентрации NO доноров 0.1 мМ [23]. Похожие закономерности показаны методом микродиализа для ядер шва при введении в эту область SNAP (5–0.5 мМ, 30 мин) [21]. Полученные в настоящей работе данные позволяют предполагать, что еще одним фактором, влияющим на знак эффекта экзогенного NO на активность серотониновой системы, по крайней мере в мПК, может быть длительность нитергической стимуляции этой области, в ходе которой активационные эффекты NO на уро-

вень внеклеточного серотонина трансформируются в тормозные.

Важным проявлением тормозного действия NO на серотониновую нейротрансмиссию в мПК является показанное в работе NO-зависимое торможение функциональной активности серотониновой системы мПК, поскольку введение в эту область 1 мМ DEA NONO в течение 45 мин предотвращает подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызываемый выработкой УРС. Ранее мы установили, что величина такого подъема влияет на степень последующей генерализации УРС [9–11]. Об этом, в частности, свидетельствует тот факт, что введение в мПК ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина, существенно увеличивающее вызываемый выработкой УРС подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК, усиливает впоследствии замирание животных на дифференцировочный сигнал, не ассоциируемый с болевым раздражением (CS–), не влияя при этом на замирание животных на условный сигнал (CS+), ранее сочетавшийся с болевым раздражением [10]. Основным результатом настоящей работы являются данные, согласно которым снижение под действием DEA NONO активации серотониновой системы мПК, вызываемой выработкой УРС, ослабляет будущую генерализацию УРС, что проявляется в уменьшении замирания животных на этапе тестирования на безопасный CS–, при неизменности замирания на потенциально опасный CS+. Эти ранее неизвестные данные впервые свидетельствуют, что в ходе формирования УРС нитрегергические сигналы в мПК могут тормозить функциональную активацию ее серотониновой системы, уменьшая ее вклад в формирование генерализованного страха.

Ранее мы показали, что выработка УРС сопровождается значительным и длительным увеличением продукции NO в мПК, о чем свидетельствует NO-синтаза-зависимый подъем в этой области уровня внеклеточного цитрулина (сопродукта синтеза NO) [12]. Причем такая эндогенная нитрегергическая активация мПК, видимо, ограничивает будущую генерализацию страха, поскольку она выше у животных с низкой генерализацией УРС и ниже у крыс с высокой генерализацией УРС [12]. Результаты настоящей работы, во-первых, подтверждают это предположение, демонстрируя, что в мПК во время выработки УРС не только эндогенные, но и экзогенные нитрегергические сигналы уменьшают генерализацию УРС. Во-вторых, они демонстрируют, что одним из механизмов NO-зависимого сдерживания генерализации страха могут быть тормозные влияния NO на серотониновую систему мПК в ходе формирования страха.

Следует подчеркнуть, что показанные в работе отсроченные эффекты DEA NONO на замирание

животных при предъявлении безопасного CS– не являются следствием влияния этого препарата на чувствительность к болевому раздражению во время обучения (рис. 5в) и на способность замирать на этапе тестирования, поскольку они не наблюдались у тех же крыс при предъявлении (рис. 5а) и ожидании (рис. 5б) потенциально опасного CS+. Маловероятно, что они вызваны неспецифическими изменениями подвижности животных, поскольку мы не обнаружили влияние этого препарата на двигательную активность в закрытых (безопасных) рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (рис. 3б, в). При этом введение DEA NONO в мПК во время выработки УРС увеличивало через сутки горизонтальную и вертикальную активность (но не длительность пребывания) в открытых рукавах крестообразного лабиринта (рис. 3), т.е. усиливало исследовательское поведение, дающее потенциальные конкурентные преимущества, без увеличения степени риска (время в тревожном окружении). Такие результаты, совместные с данными о селективном торможении генерализации УРС у крыс, ранее подвергавшихся введению DEA NONO, позволяют говорить об оптимизирующем действии длительной нитрегергической стимуляции мПК в ходе формирования страха на эти формы поведения.

Важно отметить, что в наших экспериментах введения DEA NONO проводили за сутки до тестирования на проявления тревожности (крестообразный лабиринт) и страха (CS+/CS– тесты). Вместе с тем, по данным литературы и нашим прежним результатам, полученным при введении фармакологических препаратов во время тестирования, нитрегергические сигналы мПК оказывают анксиогенное действие, усиливая проявления тревожности [24] и страха обстановки [25, 26]. То есть поведенческие эффекты стимуляции или блокады нитрегергической системы мПК, видимо, зависят от того, когда произведено фармакологическое воздействие – в ходе стресса, порождающего страх, или позже, когда память о пережитом стрессе уже сформирована и консолидирована.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показаны ранее неизвестные данные, что при формировании условной реакции страха нитрегергическая система мПК может тормозить функциональную активацию ее серотониновой системы. Причем такое NO-зависимое торможение сопровождается селективным снижением генерализации формирующегося страха, проявляющимся в уменьшении замирания животных (показатель страха) на безопасные дифференцировочные сигналы, но не на опасные условные сигналы. Данные впервые свидетельствуют, что NO-серотониновое взаимодействие в мПК может служить механизмом, обеспечивающим координированное

участие в контроле генерализации страха нитре-
ргической и серотонинергической систем мПК,
разнонаправленно регулирующих этот процесс.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnsten A.F., Raskind M.A., Taylor F.B., Connor D.F. // *Neurobiol. Stress*. 2015. V. 1. P. 89–99.
2. Rozeske R.R., Valerio S., Chaudun F., Herry C. // *Genes Brain Behav*. 2015. V. 14. № 1. P. 22–36.
3. Саульская Н.Б. // *Успехи физиол. наук*. 2018. Т. 49. № 4. С. 12–29.
4. Xu W., Sudhof T.C. // *Science*. 2013. V. 339. № 6125. P. 1290–1295.
5. Rozeske R.R., Jercog D., Karalis N., Chaudun F., Khoder S., Girard D., Winke N., Herry C. // *Neuron*. 2018. V. 97. № 4. P. 898–910.
6. Kaczurkin A.N., Burton P.C., Chazin S.M., Manbeck A.B., Espenss-Sturges T., Cooper S.E., Sponheim S.R., Lissek S. // *Am. J. Psychiatry*. 2017. V. 174. № 2. P. 125–134.
7. Vieira P.A., Corches A., Lovelace J.W., Westbrook K.B., Mendoza M., Korzus E. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2015. V. 119. P. 52–62.
8. Bayer H., Bertoglio L.J. // *Sci. Report*. 2020. V. 10. Art. 15827.
9. Саульская Н.Б., Марчук О.Э. // *Росс. физиол. журн.* 2018. Т. 104. № 4. С. 466–476.
10. Саульская Н.Б., Марчук О.Э. // *Журн. высш. нерв. деят.* 2019. Т. 69. № 3. С. 342–352.
11. Саульская Н.Б., Марчук О.Э. // *Росс. физиол. журн.* 2020. Т. 106. № 12. С. 1541–1552.
12. Саульская Н.Б., Судоргина П.В. // *Журн. высш. нерв. деят.* 2015. Т. 65. № 3. С. 372–381.
13. Ghasemi M., Claunich J., Niu K. // *Progress in Neurobiology*. 2019. V. 173. P. 54–97.
14. Zhou Q.G., Zhua X.H., Nemesb A.D., Zhu D.Y. // *IBRO Reports*. 2018. V. 5. P. 116–132.
15. Maximino C., Lima M.G., Batista E.J.O., Oliveira R.R.H.M., Herculano A.M. // *Neurosci. Lett*. 2015. V. 588. P. 54–56.
16. Chiavegatto S., Dawson V.L., Mamounasi L.A., Koliatsos V.E., Dawson T.M., Nelson R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 3. P. 1277–1281.
17. Pavesi E., Heldt S.A., Fletcher M.L. // *Learn. Mem.* 2013. V. 20. № 9. P. 482–490.
18. Саульская Н.Б., Марчук О.Э., Пузанова М.А., Трофимова Н.А. // *Нейрохимия*. 2020. Т. 37. № 4. С. 350–357.
19. Karolewicz B., Paul I.A., Antkiewicz-Michaluk L. // *Pol. J. Pharmacol.* 2001. V. 53. № 6. P. 587–596.
20. Dunn A.J. // *Neurochem. Int.* 1998. V. 33. № 6. P. 551–557.
21. Smith J.C.E., Whitton P.S. // *Neurosci. Lett*. 2000. V. 291. № 1. P. 5–8.
22. Lu Y., Simpson K.L., Weaver K.J., Lin R.C.S. // *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2010. V. 293. № 11. P. 1954–1965.
23. Kaehler S.T., Singewald N., Sinner C., Philippu A. // *Brain. Res.* 1999. V. 835. № 2. P. 346–349.
24. Vila-Verde C., Marinho A.L., Guimaraes F.S. // *Neurosci.* 2016. V. 320. № 1. P. 30–42.
25. Resstel L.B., Correa F.M., Guimaraes F.S. // *Cereb. Cortex*. 2008. V. 18. № 9. P. 2027–2035.
26. Саульская Н.Б., Судоргина П.В. // *2016. Росс. физиол. журн.* 2016. Т. 102. № 10. С. 1165–1175.

Nitric Oxide Inhibits the Functional Activation of the Medial Prefrontal Cortex Serotonin System during Fear Formation and Decreases Fear Generalization

N. B. Saulskaya^a, M. A. Burmakina^a, and N. A. Trofimova^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

We have previously shown that an acquisition of a conditioned fear response (a model of fear formation) is accompanied by an extracellular serotonin level rise in the medial prefrontal cortex, which enhances the future fear generalization. The aim of this work is to investigate the possible contribution of NO-serotonin interaction to such regulation. In Sprague-Dawley rats by means of in vivo microdialysis it was shown that the infusion of diethylamine nonoate (1 mM) into the medial prefrontal cortex via dialysis membrane increased the extracellular serotonin level in this area during the first 30 minutes of infusion, followed by its gradual decrease. Such treatment prevented the extracellular serotonin level rise in the medial prefrontal cortex, caused by the acquisition of the conditioned fear response (a paired presentation of a conditioned auditory cue (CS+) and inescapable footshock), and led in a day to a decrease in animals' freezing to a differential auditory cue (CS–), not associated with footshock (a measure of generalized fear), without affecting the freezing of the same animals to the conditioned cue (CS+), previously paired with footshock (a measure of conditioned fear). The data obtained indicate for the first time that during the conditioned fear response acquisition, nitrenergic signals in the medial prefrontal cortex inhibit the functional activation of the serotonin system, reducing its contribution to the generalized fear formation.

Keywords: medial prefrontal cortex, in vivo microdialysis, serotonin release, nitric oxide, NO-serotonin interaction, conditioned fear response, fear generalization

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577

ОВЕРЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ В ГИППОКАМПЕ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У КРЫС С ХОЛИНЕРГИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ, ИНДУЦИРОВАННЫМ 192IgG-САПОРИНОМ

© 2021 г. Ю. В. Добрякова¹, М. И. Зайченко¹, Ю. С. Спивак¹, М. Ю. Степаничев¹,
В. А. Маркевич¹, А. П. Большаков¹, *

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

Поступила в редакцию 15.02.2021 г.

После доработки 16.02.2021 г.

Принята к публикации 17.02.2021 г.

Дегенерация септальных холинергических нейронов, вызванная иммунотоксином 192IgG-сапорином (SAP), является одной из моделей патологий, возникающих при болезни Альцгеймера. Целью этой работы было исследовать влияние сверхэкспрессии фактора роста нервов (NGF) в гиппокампе на поведение крыс с вызванным холинергическим дефицитом. Лентивирусную суспензию, несущую кассету с CMV-NGF-IRES-GFP или CMV-IRES-GFP (контроль, pCSC), вводили в оба гиппокампа. Контрольные крысы вместо SAP получали эквивалентные объемы растворителя и контрольный вирус. Мы обнаружили, что сверхэкспрессия NGF в гиппокампе не предотвращает гибель холинергических нейронов в медиальной септальной области, которая вызвана инъекцией иммунотоксина. В тесте “Открытое поле” как SAP-NGF, так и SAP-pCSC-инъектированные животные были гиперактивны; напротив, в Y-образном лабиринте у подопытных животных с сверхэкспрессией NGF гиперактивность, вызванная введением иммунотоксина, была снижена. В тесте “Сужающаяся дорожка” подопытные животные, экспрессирующие NGF, показывали значительно меньшее количество ошибок. Анализ активности ацетилхолинэстеразы в гиппокампе, которую мы использовали в качестве маркера холинергической функции, показал, что уровень фермента был повышен в группе SAP-NGF по сравнению с SAP-pCSC. Из полученных нами данных можно сделать вывод, что сверхэкспрессия NGF в гиппокампе крыс лишь частично компенсирует некоторые нарушения, опосредованные развитием холинергического дефицита.

Ключевые слова: фактор роста нервов, 192IgG-сапорин, ацетилхолинэстераза, поведение

DOI: 10.31857/S102781332103002X

ВВЕДЕНИЕ

Медиальная септальная область является основным источником холинергической иннервации гиппокампа, и гибель клеток в ней, возникающая при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, приводит к нарушению функционирования всех ацетилхолин-зависимых систем. Многие исследования показали, что фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) является одним из нейротрофинов, которые поддерживают холинергическую функцию и предотвращают гибель нейронов в базальном переднем мозге [1–3]. В гиппокампе NGF вырабатывается интернейронами [4, 5], поглощается аксонами холинергических нейронов

базального переднего мозга и транспортируется в их тела [6, 7]. Таким образом, существующая концепция передачи сигналов NGF указывает на важную роль механизма ретроградного транспорта от проекционных областей холинергических нейронов к телам для их выживания и функционирования во взрослом мозге.

Положительные эффекты, вызываемые нейротрофином NGF, были описаны на различных экспериментальных моделях болезни Альцгеймера. Ранее мы показали, что сверхэкспрессия NGF в гиппокампе может предотвращать нарушение LTP в зубчатой извилине гиппокампа, которое было индуцировано введением бета-амилоида [8, 9]. Установлено также, что жизнеспособность холинергических нейронов после разрушения свода мозга (fimbria/fornix) можно поддержать с помощью внутрижелудочкового введения NGF [2] или его сверхэкспрессии в медиальной септальной об-

* Адресат для корреспонденции: 117485 Россия, Москва, ул. Бутлерова, д. 5а, тел./факс: +7(495) 334-70-00, e-mail: ocrachek@yahoo.com.

ласти [10]. Кроме того, известно, что инъекции NGF могут улучшать некоторые аспекты поведения животных с холинергическим дефицитом [11, 12]. Повышение уровня NGF в этих исследованиях приводит к лучшему выживанию нейронов медиальной септальной области либо за счет гиперэкспрессии NGF в ней [10], либо во всем мозге за счет долговременного внутрижелудочкового введения нейротрофина [2, 11, 12]. В обоих случаях NGF может действовать непосредственно на тела холинергических нейронов медиальной септальной области, обеспечивая их выживание. Один из недостатков этих подходов связан с тем, что инъекция NGF непосредственно в желудочки мозга вызывает боль у человека [13] и грызунов [14], тогда как внутривентрикулярная инъекция не оказывает такого эффекта [14, 15].

Модель разрушения свода мозга, используемая в описанных выше исследованиях, не позволяет правильно оценить степень восстановления гиппокампальных функций при введении NGF вследствие полной потери септо-гиппокампальных связей. В другой серии экспериментов [11, 12], где септо-гиппокампальные связи были сохранены, NGF вводили в желудочки, что не дает сделать однозначный вывод о том, развивался ли защитный эффект нейротрофина за счет внутригиппокампального действия, поскольку NGF вызывал изменения даже в ряде удаленных областей мозга, таких, например, как ствол мозга [11]. Остается неясным, может ли гиперэкспрессия NGF в гиппокампе, не вызывающая болевых ощущений, наряду с внутривентрикулярными инъекциями, оказывать защитное действие, и действительно ли этот эффект зависит от выживания нейронов базального переднего мозга.

Основываясь на идее о центральной роли ретроградного транспорта в выполнении защитной функции NGF в холинергических нейронах переднего мозга, здесь мы использовали хорошо известную модель дегенерации септальных холинергических нейронов, вызванную иммунотоксином 192IgG-сапорином [16], чтобы определить, может ли гиперэкспрессия NGF в гиппокампе защитить нейроны медиальной септальной области от дегенерации и уменьшить последствия холинергического дефицита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на половозрелых самцах крыс линии Wistar (250–350 г), полученных из питомника “Пушино” Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Животных содержали в условиях вивария при температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ с 12-часовым циклом свет/темнота, пищу и воду предоставляли *ad libitum*. Все эксперименты проводились в соответствии с этическими

принципами, изложенными в директиве 2010/63/ЕС Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г., и были одобрены этическим комитетом Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской Академии наук. Перед операцией животные были случайным образом разделены на группы. Поведенческие эксперименты проводили с 10.00 до 14.00.

Синтез плазмид и получение вирусов. Мы использовали ранее описанные плазмиды для упаковки лентивирусов [8]. Лентивирусы были упакованы и сконцентрированы, как описано в наших предыдущих исследованиях [8]. Клетки HEK293T были трансфицированы с использованием кальций-фосфатного метода. Для сборки конструкторов были использованы следующие плазмиды: 12 мкг pLenti, 7.8 мкг pMDL, 4.2 мкг pVSV-G и 3 мкг pRev. Плазмида pCSC-CMV-hNGF-IRES-GFP, несущая ген NGF, и плазмида pCSC-CMV-IRES-GFP, которая была использована как контроль. Супернатанты, собранные через 24 и 48 ч после трансфекции концентрировали при 50000 g в ультрацентрифуге CP80WX (Hitachi, Япония). Осадок ресуспендировали в среде OPTI-MEM, аликвотировали и хранили при температуре -80°C . Титр вируса проверяли в серийных разведениях на клетках HEK293T. Согласно нашим предыдущим данным [8], метод гиперэкспрессии приводит примерно к двукратному увеличению уровня белка NGF в гиппокампе и заражению около 2.5 мм^3 ткани мозга [17].

Операция и введение иммунотоксина и вирусных конструкторов. Иммунотоксин 192IgG-сапорин или эквивалентный объем растворителя (фосфатно-солевой буфер PBS) вводили билатерально внутрь желудочков с использованием доз и координат, описанных ранее [18]. Одновременно с инъекциями иммунотоксина проводили билатеральные инъекции лентивируса (AP – 2.9 мм, L – 1.7 мм от брегмы). Препарат вводили с помощью микроинфузионного насоса (Stoelting Co., США) со скоростью 0.2 мкл/мин. После каждой инъекции иглу оставляли на месте на 10 мин. Были сформированы три экспериментальные группы: 11 подопытных животных получили PBS и контрольную конструкцию (группа PBS-pCSC), 14 крыс получили комбинированную инъекцию 192IgG-сапорина и контрольной вирусной конструкции (группа SAP-pCSC), 14 крысам вводили 192IgG-сапорин и вирусную суспензию, экспрессирующую NGF (группа SAP-NGF). Крысам давали восстановиться в течение 21 дня после операции. Пять животных были удалены из анализа в группе SAP-pCSC, а одно животное было удалено из группы SAP-NGF после верификации места инъекции и анализа гибели клеток.

Исследование поведения. Поведенческие тесты проводили с 21 по 40 день после введения токсина. Животных тестировали в следующих тестах: водный

лабиринт Морриса (21–31 день), “открытое поле” (32 день), “сужающаяся дорожка” (33–37 дни), Y-образный лабиринт (38 день) и пассивное избегание (39–40 дни).

Водный лабиринт Морриса (день 21–31). Оценку пространственной памяти проводили в водном лабиринте Морриса. Круглый бассейн черного цвета диаметром 1.5 м и высотой стенок 60 см (Noldus, Ltd., Нидерланды) наполняли водой до уровня 30 см. Воду в бассейне не забеливали. На стенах комнаты, где расположен бассейн, прикрепляли внешние ориентиры в виде квадрата, креста и треугольника. Бассейн условно разделяли на 4 квадранта. Точки пересечения прямых со стенками бассейна служили местами погружения подопытных животных в воду (условно – север, юг, запад, восток). В центре одного из квадрантов располагалась прозрачная круглая платформа диаметром 10 см, погруженная на 1.5–2 см под воду. Для каждой попытки крысу помещали в исходную точку бассейна мордой к стене. Обучение подопытных животных, которое проводили с 21-го по 30-й день, включало в себя две ежедневные попытки продолжительностью не более 60 с в соответствии с ранее использованным протоколом [18]. Интервал между испытаниями составлял около 30 мин для каждой крысы. Регистрировали следующие параметры: латентный период нахождения платформы, суммарная проплываемая дистанция, скорость передвижения. На 31-й день (10-й день тестирования) платформу извлекали из бассейна и в течение 60 с регистрировали время и дистанцию, проплываемую в каждом квадранте. Поведение записывали на видео и автоматически оценивали с помощью программного обеспечения Ethovision (Noldus, Wageningen, NL).

Тест “открытое поле” (32-й день). В тесте “открытое поле” изучали двигательную и исследовательскую активность. Установка представляла собой круглую арену диаметром 1 м, окруженную стенкой высотой 50 см. Арена была расчерчена на три равные концентрические зоны (центральную, среднюю и периферийную). Каждую крысу помещали в центр арены и автоматически записывали ее поведение в течение 5 мин при красном свете на видео и оценивали с помощью программного обеспечения Ethovision (Noldus, Wageningen, NL). Количественно оценивали следующие поведенческие параметры: суммарная пройденная дистанция (см), скорость (см/мин), вертикальная активность (число стоек), число и длительность реакций умыывания и число входов в центр арены.

Тест “Сужающаяся дорожка” (33–37-й дни). Сенсомоторную координацию оценивали в тесте “сужающаяся дорожка”, согласно ранее использованному протоколу [19, 20]. Пластиковая планка длиной 200 см была приподнята на 80 см над полом и разделена на четыре сегмента по 50 см и

оканчивалась пластиковой камерой. Планка по ширине варьировала от 1.5 см около камеры до 6 см на конце. Первые 4 дня подопытное животное обучали доходить до целевой камеры, высиживая на разное расстояние от нее. Проверку выработки навыка осуществляли на 5-й день тестирования. Для оценки применяли балльную систему подсчета. Итоговая оценка включала в себя сумму трех испытаний, причем баллы присваивались отдельно за каждый из четырех 50-см сегментов дорожки (максимальная оценка 12 баллов за 3 испытания). 0 баллов присваивали, если животное соскользнуло лапой с поверхности балки, оценку 1 балл давали, если крыса прошла сегмент без ошибок.

Тест спонтанного чередования рукавов в Y-образном лабиринте (38-й день). Кратковременную память оценивали, исследуя поведение чередования в Y-лабиринте, согласно протоколу [21]. Установка состояла из трех равных рукавов размером $42.5 \times 14.5 \times 22.5$ см, расходящихся из центра под углом 120° . Подопытное животное помещали в центр лабиринта и в течение 8 мин позволяли свободно перемещаться по лабиринту. Регистрировали последовательность входов в рукава. Чередование определяли как последовательные входы в рукава лабиринта без возврата в ранее посещенный рукав или рукав, из которого животное вышло в данный момент времени. Долю чередований оценивали как $(\text{число чередований} / \text{число входов} - 2) \times 100$.

Выработка и воспроизведение условной реакции пассивного избегания (39–40-й день). Камера для выработки условной реакции пассивного избегания (УРПИ) представляла собой пластиковую коробку (OpenScience, Россия), разделенную на два равных отсека ($30 \text{ см} \times 30 \text{ см} \times 30 \text{ см}$): один отсек с белыми стенками был ярко освещен, другой имел крышку и темные непрозрачные стенки. Двери между отсеками не было. Во время предварительного тестирования подопытное животное помещали в светлый отсек камеры на 5 мин для ознакомления. Через час после ознакомительного тестирования крысу снова помещали в светлый отсек камеры. Когда животное входило в темный отсек, оно получало электроболеу стимуляцию в течение 5 с (100 В, 100 Гц). После стимуляции животное возвращали в домашнюю клетку. Проверку сохранности УРПИ проводили через 24 ч после процедуры обучения. Во время тестирования оценивали следующие показатели: латентный период входа животного в темный отсек и общее время, проведенное животным в светлом отсеке камеры. Показателем сохранности навыка служила величина латентного периода входа в темный отсек во время теста. Критерием обученности животных считали значения ЛП больше 100 с.

Подготовка биологического материала. Через 1 сут после окончания поведенческих экспери-

ментов (примерно 1.5 мес. после инъекций) подопытных животных анестезировали и транскардиально перфузировали ледяным 0.9% NaCl. Переднюю часть мозга, с медиальной септальной областью, помещали в 4% раствор параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в фосфатно-солевом буфере (PBS, Biotol, Россия) минимум на 2 дня. Оставшуюся часть мозга разрезали по средней линии, из левой половины выделяли гиппокамп и далее использовали его для оценки активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ), правую половину дофиксировали в 4% параформальдегиде для иммуногистохимической оценки эффективности трандукции.

Иммуногистохимия. После 48 ч фиксации из образцов мозга с помощью вибротома (Leica VT1200 S, Leica Biosystems, ФРГ) получали фронтальные срезы медиальной септальной области толщиной 50 мкм. Собранные срезы хранили в криопротекторе при -18°C . По четыре среза от каждого животного иммуногистохимически окрашивали на холинацетилтрансферазу (ХАТ) и анализировали гибель холинергических нейронов в медиальной септальной области. Для этого свободно плавающие срезы инкубировали в 0.3% Triton X-100 (SERVA, Германия) в 0.01 М PBS (PBS-T), а затем, в течение 1 ч, в блокирующем растворе (5% неиммунная сыворотка козы (Sigma-Aldrich, США) в PBS-T). После этого срезы помещали в блокирующий раствор с первичными антителами (поликлональные антитела кролика к ХАТ 1 : 500, Santa Cruz Biotechnology, США) при температуре 4°C на ночь. На следующий день срезы отмывали в PBS-T и инкубировали с вторичными антителами (1 : 800, антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с биотином (Sigma-Aldrich, США)) в блокирующем растворе при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки в PBS, срезы инкубировали с комплексом авидин—биотин—HRP (ABC Elite kit, Vector Labs, США) в течение 1 ч и 3,3'-диаминобензидином (Sigma-Fast Kit, Sigma-Aldrich, США), который был использован в качестве хромогена.

Из правого полушария мозга получали фронтальные срезы гиппокампа толщиной 50 мкм. Четыре среза гиппокампа, которые включали место инъекции, были окрашены антителами к зеленому флюоресцентному белку (GFP). Срезы последовательно инкубировали в 0.3% Triton X-100 (SERVA, Германия) в 0.01 М PBS, затем в течение 1 ч в блокирующем растворе и в блокирующем растворе с первичными антителами (анти-GFP 1 : 500, Invitrogen, США) при температуре 4°C в течение ночи. На следующий день срезы промывали в PBS-T и инкубировали с вторичными антителами (антитела козы к IgG кролика-Alexa 488, 1 : 500).

Дополнительно по 4 среза гиппокампа от каждого животного были окрашены с использованием антител к нейрональному белку NeuN, как описано

выше, за исключением того, что в качестве первичных антител использовали антитела кролика к NeuN (1 : 500, Millipore, США).

Все изображения исследуемых областей получали с помощью микроскопа Leica DM6000B (Leica Microsystems, Германия). Параметры визуализации были установлены таким образом, чтобы избежать насыщения сигнала.

Измерение активности ацетилхолинэстеразы. Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) оценивали методом, основанным на образовании аниона 5,5'-дифенил-2-нитробензойной кислоты (ДТНБ); оценку проводили спектрофотометрически по поглощению при 412 нм [22]. Образцы гиппокампа гомогенизировали в ледяном буфере, в состав которого входили: 100 мм Tris-HCl, pH 7.0, 1 М NaCl, 4 мМ EDTA, 2% Triton X-100, 0.1% азида натрия и ингибитор протеаз (Roche, Швейцария). Гомогенаты центрифугировали (14000 g, 30 мин) при температуре 4°C . Скорость гидролиза ацетилхолина измеряли в инкубационной среде, содержащей 0.4 мМ ацетилхолин иодид, буфер для гомогенизации (pH 7.0) и 0.1 мМ DTNB. В реакционную смесь добавляли 40 мкл супернатанта, инкубировали в течение 2 мин при температуре 30°C , далее в течение 3 мин отслеживали уровень гидролиза по образованию тиолатдианиона DTNB при 412 нм (интервалы 20 с) при 30°C . Все реакции проводили в дубликатах. Результаты выражали в ед./г массы ткани.

Статистическая обработка данных. Для оценки статистической значимости эффектов, вызванных введением иммунотоксина, использовали параметрические (*t*-тест Стьюдента) и непараметрические (*U*-тест Манна—Уитни, и тест Вилкоксона) критерии, а также двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с двумя межгрупповым (“введение иммунотоксина”, “введение конструкции, несущей NGF”) и одним внутригрупповым (повторные измерения в ходе тестирования) факторами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы оценили, может ли оверэкспрессия NGF в гиппокампе предотвратить нарушения поведения, вызванные инъекциями иммунотоксина 192IgG-сапорина. Оценка пространственной памяти в водном лабиринте Морриса существенных различий между группами не выявила. Суммарная проплываемая дистанция и скорость передвижения существенно не отличались между группами. На 10-й день во время проверки сохранности пространственной памяти групповых эффектов выявлено не было (рис. 1).

Далее мы проанализировали параметры двигательной и исследовательской активности крыс в тесте “Открытое поле”. Крысы обеих групп, которым вводили 192IgG-сапорин (контрольный вирус,

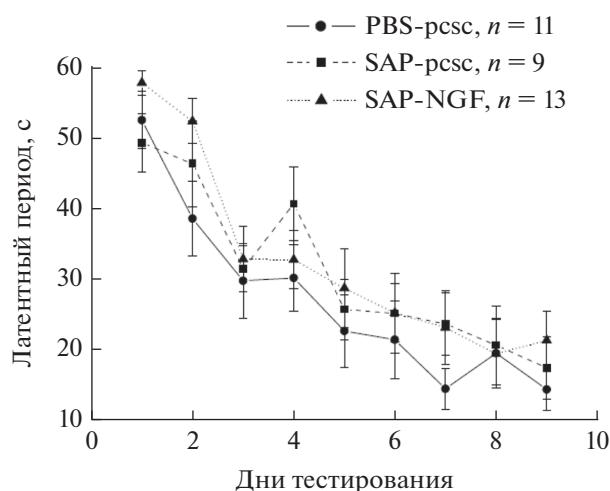


Рис. 1. Изменения латентного периода нахождения платформы в тесте водный лабиринт Морриса в течение 9 дней обучения. Животным вводили PBS и контрольную конструкцию (PBS-pcsc, $n = 11$), 192IgG-saporin и контрольную конструкцию (SAP-pcsc, $n = 9$) и 192IgG-сапорин и NGF-несущий вирус (SAP-NGF, $n = 13$). 192IgG-сапорин и комбинированные инъекции иммунотоксина и лентивируса не вызвали каких-либо изменений в тесте по сравнению с контролем. Значимых изменений выявлено не было.

SAP-pCSC; NGF-несущий вирус, SAP-NGF), проходили большую дистанцию и демонстрировали повышенный уровень вертикальной активности во время тестирования. ANOVA выявил значимый групповой эффект для пройденной дистанции ($F(2,30) = 6.22$, $P < 0.01$), скорости передвижения подопытных животных ($F(2,30) = 6.24$, $P < 0.01$) и длительности стоек ($F(2,30) = 4.25$, $P < 0.05$); все эти показатели были существенно выше в группах SAP-pCSC и SAP-NGF по сравнению с контрольной группой (рис. 2а–в).

Сенсомоторную координацию оценивали в тесте “Сузаящаяся дорожка”. Введение 192IgG-сапорина приводило к нарушению координации и снижению соответствующего показателя в баллах (рис. 3а) в группе SAP-pCSC по сравнению с контрольной группой. Оверэкспрессия NGF в гиппокампе приводила к улучшению прохождения дорожки во время теста и увеличению суммарного количества баллов, полученного подопытными животными во время тестирования, до контрольного уровня. Более того, количество баллов, которое набрали животные, в группе SAP-NGF, было значительно выше по сравнению с группой SAP-pCSC. ANOVA также подтвердил наблюдавшийся эффект в тесте “Сузаящаяся дорожка” (фактор “группа” ($F(2,30) = 7.5$, $P < 0.01$) (рис. 3а).

Поведение спонтанного чередования рукавов в Y-образном лабиринте позволило оценить состояние рабочей памяти. Оказалось, что животные, получавшие SAP-pCSC, демонстрировали выра-

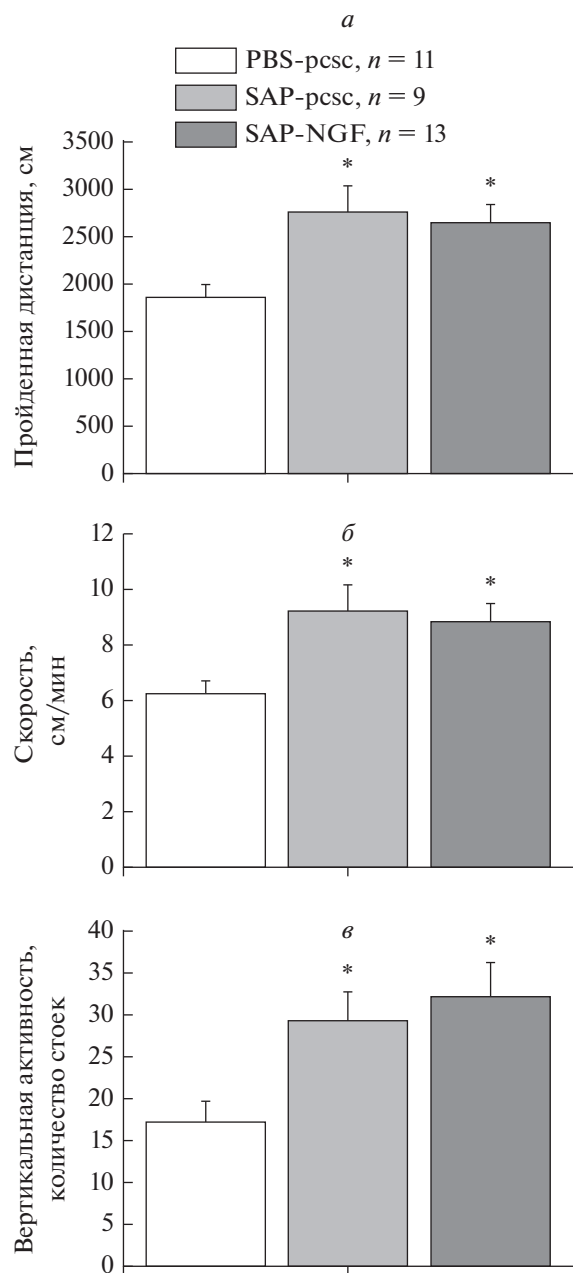


Рис. 2. Пройденная дистанция (а), скорость (б) и вертикальная активность (в) в тесте “Открытое поле”. Животным вводили PBS и контрольную конструкцию (PBS-pcsc, $n = 11$), 192IgG-сапорин и контрольную конструкцию (SAP-pcsc, $n = 9$), а также 192IgG-сапорин и NGF-несущий вирус (SAP-NGF, $n = 13$). Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ ошибка среднего. Значимые отличия ($p < 0.05$) отмечены *, значимые межгрупповые различия ($p < 0.05$) отмечены #.

женное нарушение чередования по сравнению с группой PBS-pCSC (рис. 3в; $P < 0.05$). Оверэкспрессия NGF в группе SAP-NGF существенно не влияла на поведение подопытных животных в Y-образном лабиринте (рис. 3в). Интересно, что крысы,

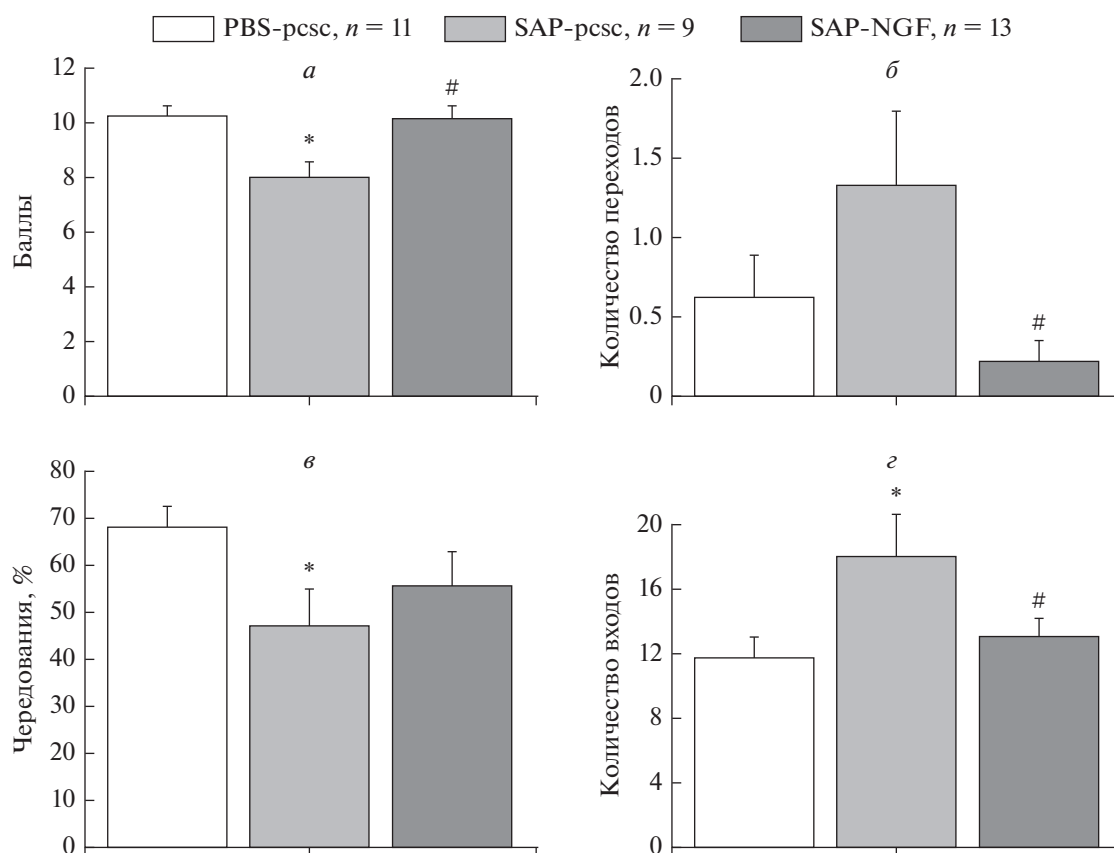


Рис. 3. На панели (а) показаны результаты, полученные в тесте “Сужающаяся дорожка” у крыс, которым вводили PBS и контрольную конструкцию вирус (PBS-pcsc, $n = 11$), 192IgG-сапорин и контрольную конструкцию (SAP-pcsc, $n = 9$) и 192IgG-сапорин и NGF-несущий вирус (SAP-NGF, $n = 13$). На панели (б) приведены результаты по количеству переходов между отсеками в ходе тестирования о время проверки выработки навыка в тесте УРПИ. Панели (в, г) представляют процент правильных чередований в тесте Y-образный лабиринт. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ ошибка среднего. Значимые отличия от контрольного уровня ($p < 0.05$) отмечены *, значимые межгрупповые различия ($p < 0.05$) отмечены #.

инъекции 192IgG-сапорином, демонстрировали большее число входов в рукава лабиринта, что подтверждалось результатами ANOVA (фактор “группа” $F(2,29) = 3.65$, $p < 0.05$). У крыс группы SAP-NGF наблюдалась тенденция к нормализации двигательной активности, однако показатель не достигал уровня достоверности ($p = 0.06$; рис. 3г).

Анализ влияния гиперэкспрессии NGF у крыс с холинергическим дефицитом, вызванным 192IgG-сапорином, на выработку УРПИ существенных межгрупповых различий не выявил (данные не приведены). Однако и в этом случае двигательная активность (суммарное число переходов между отсеками) крыс группы SAP-pCSC в ходе тестовой сессии была выше по сравнению с группой SAP-NGF ($F(2,30) = 3.6$, $P < 0.05$; рис. 3б).

Иммуногистохимический анализ срезов мозга, проведенный после завершения всех поведенческих экспериментов, показал, что инъекции 192IgG-сапорина индуцировали гибель большинства ХАТ-содержащих нейронов в медиальной септальной области. Гибель ХАТ-содержащих

клеток в этой области варьировала в пределах от 40 до 90% (рис. 4а–в). ANOVA выявил значимый эффект фактора “группа” (рис. 4з; $F(2,29) = 17.1$, $P < 0.01$). Кроме того, активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в гиппокампе крыс, которым вводили 192IgG-сапорин, была снижена по сравнению с контролем (рис. 4и), вероятно, отражая компенсаторную реакцию гиппокампа на холинергический дефицит, индуцированный иммунотоксином.

Уровень экспрессии вируса, несущего контрольную конструкцию или NGF, определяли с помощью иммунофлуоресцентной детекции GFP в срезах гиппокампа (рис. 4ж). Само по себе введение подопытным животным вирусной конструкции не вызывало существенными структурными изменениями в гиппокампе, что подтверждалось данными иммуногистохимического окрашивания на NeuN (рис. 4з–е). Несмотря на то, что гиперэкспрессия NGF в гиппокампе не предотвращала гибель холинергических нейронов в медиальной септальной области, она восстанавливала активность АХЭ в гиппокампе.

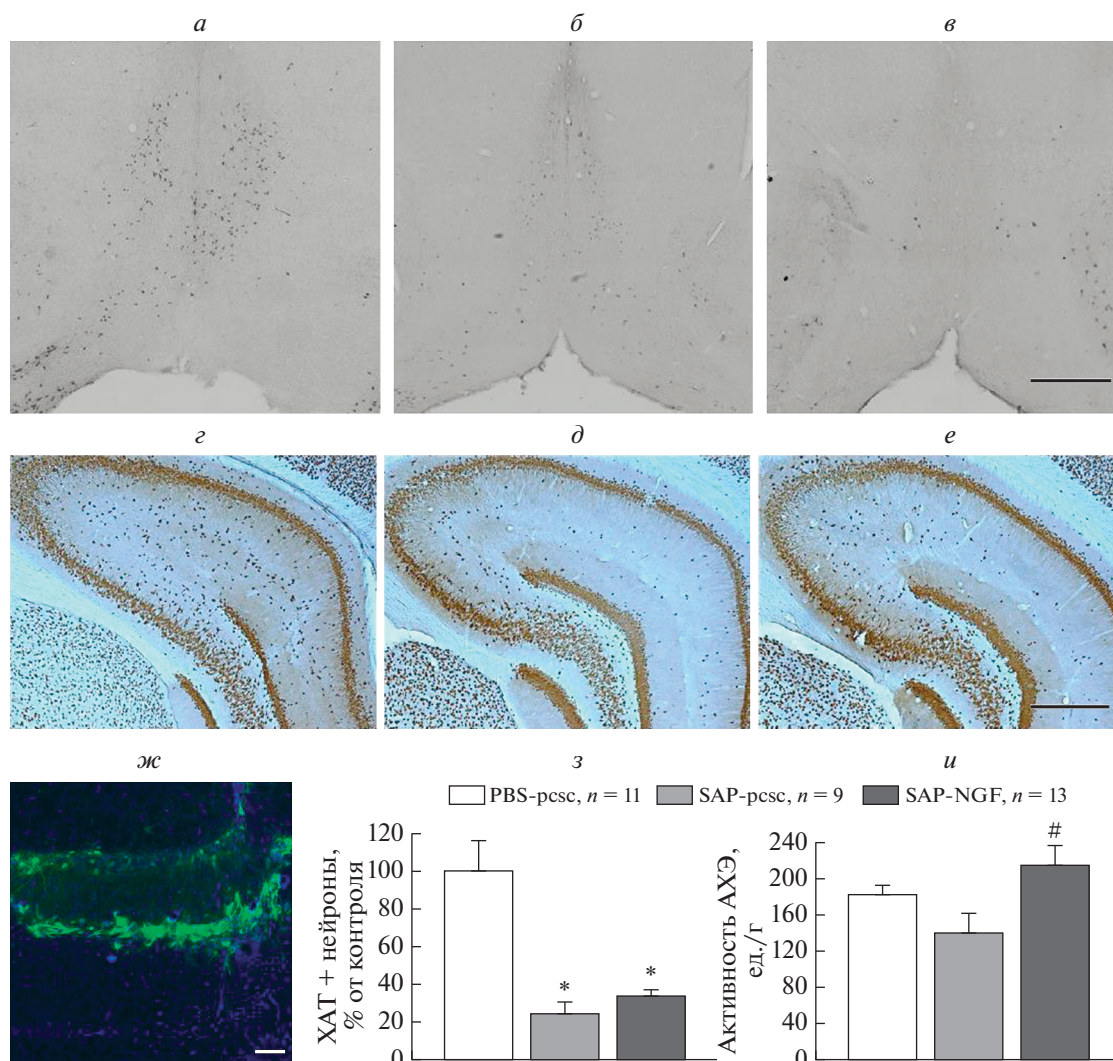


Рис. 4. На панелях (*a–в*, *з*) представлено иммунное окрашивание на холинацетилтрансферазу (XAT) в медиальной септальной области у крыс с внутрисептальной инъекцией PBS (*a*), 192IgG-сапорина (*б*) или 192IgG-сапорина и NGF-несущего конструкта (SAP-NGF) (*в*) и число XAT-позитивных нейронов в медиальной септальной области (*з*). На панелях (*г–е*) показано влияние 192IgG-сапорина на выживаемость нейронов в области СА3 гиппокампа. Представлены срезы мозга крыс после внутрисептальных инъекций PBS (*г*), 192IgG-сапорина (*д*) или 192IgG-сапорина и NGF-несущего конструкта (SAP-NGF) (*е*) были окрашены на NeuN. На панели (*ж*) представлено иммуногистохимическое окрашивание среза гиппокампа на GFP у крыс с сверхэкспрессией NGF. На панели (*и*) представлены данные по активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в гиппокампе крыс, которым вводили PBS и контрольный вирус (PBS-рсsc, $n = 11$), 192IgG-сапорин и контрольный конструкт (SAP-рсsc, $n = 9$) и 192IgG-сапорин и NGF-несущий вирус (SAP-NGF, $n = 11$) через 1.5 мес. после инъекции. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ ошибка среднего. *, достоверные различия по сравнению с группой PBS-рсsc, $p < 0.05$; #, достоверные межгрупповые различия, $p < 0.05$. Шкала: *a–в* и *г–е* – 500 мкм; *ж* – 100 мкм.

Суммируя полученные данные, мы можем заключить, что в некоторых тестах 192IgG-сапорин вызывал нарушения поведения, которые в ряде случаев восстанавливались в результате сверхэкспрессии NGF в гиппокампе. В отличие от почти полного отсутствия защитного эффекта в медиальной септальной области, где расположены тела холинергических нейронов, в гиппокампе сверхэкспрессия NGF восстанавливала уровень активности АХЭ до контрольного уровня.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гипотеза, положенная в основу этой работы, предполагала, что нейродегенеративные изменения в медиальной септальной области, вызванные внутрижелудочковым введением иммунотоксина 192IgG-сапорина, будут предотвращены повышенной секрецией NGF вследствие сверхэкспрессии гена, кодирующего этот нейротрофин, в гиппокампе. Гиппокамп является структурой мозга, куда проецируются холинергические ней-

роны медиальной септальной области. Хорошо известно, что потеря холинергических нейронов базального переднего мозга является одним из ранних маркеров патогенеза ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона с деменцией. Одним из предлагаемых терапевтических подходов для предотвращения этой потери является обеспечение дополнительной трофической поддержки этих нейронов [23].

Как предполагалось, внутрижелудочковая инъекция 192IgG-сапорина вызвала ярко выраженное снижение числа ХАТ-позитивных нейронов в медиальной септальной области и диагональной полоске Брока, однако оверэкспрессия NGF в гиппокампе не предотвратила гибель этих нейронов. Ранее Lee et al. показали, что введение NGF в желудочки мозга защищало холинергические нейроны медиальной перегородки и базального ядра от дегенерации, индуцированной инъекциями 192IgG-сапорина [12]. Авторы использовали очень низкую дозу токсина (20 нг против дозы 8 мкг, использованной в нашем исследовании), вызывающую лишь 30% потерю иммунореактивности. 192IgG-сапорин — вещество, токсическое действие которого основано на инактивации рибосом [24]. Низкая доза токсина, вероятно, вызвала подавление синтеза белка, а не гибель нейронов. В нашей работе была использована достаточно высокая доза токсина, что привело к 40–70% гибели ХАТ-позитивных клеток в медиальной септальной области. Это может быть одной из причин, объясняющей очевидное противоречие между настоящим исследованием и данными, полученными Lee et al. [12].

Вирусная вектор-опосредованная доставка гена NGF позволила произвести трансдукцию нейронов и, вероятно, клеток глии в относительно небольшом объеме гиппокампа. По нашим предыдущим данным [8, 9], этот метод доставки NGF приводит к тому, что концентрация суммарного NGF в гиппокампе достигает примерно 1.6 пг/мг белка. Мы предполагаем, что даже в условиях непрерывной секреции NGF этот уровень недостаточен, для предотвращения развития холинергической дегенерации. Уровень NGF, полученный в наших экспериментах, был на несколько порядков ниже, чем тот уровень белка, которого достигли Lee et al. [12] при хроническом введении нейротрофина. По-видимому, не последнюю роль играет и расположение места инъекции и/или экспрессии. NGF, синтезируемый в гиппокампе, должен достичь тел холинергических нейронов, чтобы поддерживать их выживание. Для этого необходима целостность аксонов, что было продемонстрировано ранее с помощью ретроградного мечения флуоресцентными микросферами [25]. По всей видимости, доставка NGF к телам холинергических нейронов является более важным фактором для

выживания клеток, чем наличие избытка NGF в клетках-мишенях. Этот вывод подтверждается данными о том, что введение в базальное ядро аденоассоциированного вируса, несущего NGF, на фоне дегенерации, вызванной разрушением свода мозга, защищает нейроны от дегенерации [26]. Следует также отметить, что в нашей работе введение вирусных конструкций в гиппокамп проводили одновременно с инъекцией иммунотоксина в боковые желудочки. По данным литературы, экспрессия целевых белков обычно начинается через 2–3 дня после инъекции, тогда как нейродегенеративные изменения, вызванные 192IgG-сапорином, начинаются только через 4 дня после инъекции и длятся, по крайней мере, 7 дней [27]. Последнее означает, что, хотя повышение уровня NGF началось еще до начала развития нейродегенеративных процессов, оно не смогло предотвратить дегенерацию ХАТ-позитивных нейронов в медиальной септальной области. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что экспрессии NGF в гиппокампе недостаточно для поддержания жизнеспособности холинергических нейронов в медиальной септальной области.

Отсутствие NGF-опосредованной защиты нейронов медиальной септальной области не означает, что NGF не оказывал положительного влияния на функциональную активность гиппокампа и/или других отделов мозга. Оверэкспрессия нейротрофина привела к восстановлению активности АХЭ до контрольного уровня, что указывает на то, что NGF вовлечен в функционирование холинергической системы гиппокампа. Поскольку активность АХЭ определяется уровнем секреции ацетилхолина, можно предположить, что оверэкспрессия NGF повышала холинергический тонус в гиппокампе, несмотря на дегенерацию значительной части холинергических нейронов медиальной септальной области. Этот эффект может быть результатом разрастания оставшихся холинергических волокон в гиппокампе [28–30] или усиления прорастания симпатических волокон [31] и трансдифференцировки норадренергических нейронов верхних шейных ганглиев симпатического ствола в холинергический фенотип [32].

Проведенные поведенческие эксперименты показали, что оверэкспрессия NGF на фоне холинергического дефицита не вызвала существенных изменений при обучении в водном лабиринте Морриса. Хорошо известно, что для выявления дефицита обучения и памяти в этом тесте необходимо, чтобы уровень гибели холинергических нейронов был максимальным [19, 33]. В настоящей работе уровень холинергической дегенерации был ниже (40–70% от контрольного уровня) по сравнению с нашими предыдущими результатами. Этот факт может объяснить отсутствие поведенческих нарушений в группах SAP-PCSC и SAP-NGF. Только крысы с максимальной гибелью клеток в

медиальной септальной области (80–90%) демонстрируют поведенческие нарушения [33].

Крысы, получавшие 192IgG-сапорин, демонстрировали гиперактивность в тесте “открытое поле”. Эти данные согласуются с предыдущими результатами [19]. Однако механизм, лежащий в основе гиперактивности, которая сохранялась у крыс, получавших SAP-NGF, может отличаться от того, что обусловлен собственно холинергическим дефицитом. Оверэкспрессия NGF способствует восстановлению активности АХЭ в гиппокампе даже в условиях гибели значительной части холинергических нейронов, предполагая, что оверэкспрессия NGF каким-то образом компенсирует функциональные последствия потери холинергических септальных нейронов. Однако, восстановление холинергической передачи в гиппокампе не предотвращает тех изменений, которые были выявлены в тесте “открытое поле”. Отсутствие положительного эффекта NGF может быть вызвано, по крайней мере, двумя причинами: (1) NGF сам по себе может повышать двигательную активность у крыс [34] и (2) дегенерация септальных холинергических нейронов, вызванная введением 192IgG-сапорина внутрь желудочков мозга, может иметь дополнительные эффекты, не связанные с гибелью септальных нейронов, такие, например, как воспаление в гиппокампе [18, 35] и изменение состояния микроглии в неокортексе [36].

Интересным представляется то, что 192IgG-сапорин приводил к нарушению моторной координации по сравнению с контролем в тесте “сужающаяся дорожка”, а оверэкспрессия NGF в гиппокампе компенсировала это нарушение. Полученный результат частично соответствует предыдущим данным о том, что холинергический дефицит в гиппокампе приводит к нарушению активности в этом тесте [19, 20]. Эти изменения связывают либо с холинергической денервацией лобно-теменной коры [37], либо с нарушением функционирования клеток Пуркинье в мозжечке [38, 39]. Однако в нашем случае комбинированная инъекция 192IgG-сапорина с NGF-кодирующим лентивирусом значительно улучшает показатели, характеризующие поведение подопытных животных в тесте “сужающаяся дорожка”. Можно предположить, что наблюдаемые поведенческие изменения, вызванные холинергической дегенерацией, вероятно, связаны с нарушением функции гиппокампа, поскольку избыточная экспрессия NGF приводила к частичной коррекции этих дефицитов. Возможно, улучшению поведения в этом тесте способствует восстановление холинергического тона в гиппокампе, о котором упоминалось выше, и, как следствие, функций холинергической системы, важных для выполнения исследуемого поведения.

Таким образом, экспрессия NGF в клетках гиппокампа не влияла на уровень гибели нейронов в медиальной септальной области, хотя частично смягчала негативные функциональные проявления холинергического дефицита. Тот факт, что оверэкспрессия NGF не вызвала полного восстановления поведения подопытных животных, несмотря на компенсацию холинергического дефицита в гиппокампе, может быть важен для разработки терапии нейродегенеративных заболеваний, поскольку гипофункция холинергических нейронов является одним из маркеров болезни Альцгеймера. В совокупности наши данные свидетельствуют о том, что оверэкспрессия NGF в гиппокампе может лишь частично защитить от последствий дегенерации, вызванных холинергическим дефицитом, и полная компенсация может потребовать более сложных решений.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ 16-15-10403.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Этическое одобрение. Все эксперименты проводились в соответствии с этическими принципами, изложенными в директиве 2010/63/ЕС Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и были одобрены этическим комитетом Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hefti F. // J. Neurobiol. 1994. V. 25. P. 1418–1435.
2. Williams L.R., Varon S., Peterson G.M., Victorin K., Fischer W., Bjorklund A., Gage F.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 9231–9235.
3. Winkler J., Thal L.J. // Exp. Neurol. 1995. V. 136. P. 234–50.
4. Zeisel A., Muñoz-Manchado, A.B., Codeluppi S., Lönnnerberg P., La Manno G., Juréus A., Marques S., Munguba H., He L., Betsholtz C., Rolny C., Castelo-Branco G., Hjerling-Leffler J., Linnarsson S. // Science. 2015. V. 347. № 6226. P. 1138–1142.
5. Cembrowski M.S., Bachman J.L., Wang L., Sugino K., Shields B.C., Spruston N. // Neuron. 2016. V. 89. P. 351–368.
6. Seiler M., Schwab M.E. // Brain Res. 1984. V. 300. P. 33–39.
7. Schwab M.E., Otten U., Agid Y., Thoenen H. // Brain Res. 1979. V. 168. P. 473–483.
8. Ivanov A.D., Tukhbatova G.R., Salozhin S.V., Markevich V.A. // Neuroscience. 2015. V. 289. P. 114–122.
9. Uzakov S.S., Ivanov A.D., Salozhin S.V., Markevich V.A., Gulyaeva N.V. // Brain Res. 2015. V. 1624. P. 398–404.

10. Blesch A., Conner J., Pfeiffer A., Gasmi M., Ramirez A., Britton W., Alfa R., Verma I., Tuszyński M.H. // *Mol. Ther.* 2005. V. 11. P. 916–925.
11. Winkler J., Ramirez G.A., Thal L.J., Waite J.J. // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. P. 834–844.
12. Lee Y., Danandeh A., Baratta J., Lin C., Yu J., Robertson R.T. // *Exp. Neurol.* 2013. V. 249. P. 178–186.
13. Jönghagen M.E., Nordberg A., Amberla K., Bäckman L., Ebendal T., Meyerson B., Olson L., Seiger Å., Shigeta M., Theodorsson E., Viitanen M., Winblad B., Wahlund L.O. // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 1998. V. 9. P. 246–257.
14. Hao J.X., Ebendal T., Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Eriksson Jönghagen, M. // *Neurosci. Lett.* 2000. V. 286. P. 208–212.
15. Pizzo D.P., Thal L.J. // *Neuroscience.* 2004. V. 124. P. 743–755.
16. Schliebs R., Roßner S., Bigl V. // *Prog. Brain Res.* 1996. V. 109. P. 253–264.
17. Tukhbatova G.R., Kuleshova E.P., Stepanichev M.Y., Ivanov A.D., Salozhin S.V. // *Neurochem. J.* 2011. V. 5. № 4. P. 294–300.
18. Dobryakova Y.V., Kasianov A., Zaichenko M.I., Stepanichev M.Y., Chesnokova E.A., Kolosov P.M., Markevich V.A., Bolshakov A.P. // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. V. 10.
19. Lehmann O., Jeltsch H., Lazarus C., Tritschler L., Bertrand F., Cassel J.C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002. V. 72. P. 899–912.
20. Lehmann O., Jeltsch H., Lehnardt O., Pain L., Lazarus C., Cassel J.C. // *Eur. J. Neurosci.* 2000. V. 12. № 1. P. 67–79.
21. Stepanichev M., Markov D., Pasikova N., Gulyaeva N. // *Behav. Brain Res.* 2016. V. 297. P. 5–14.
22. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 7. P. 88–95.
23. Appel S.H. // *Ann. Neurol.* 1981. V. 10. № 6. P. 499–505.
24. Bolshakov A.P., Stepanichev M.Y., Dobryakova Y.V., Spivak Y.S., Markevich V.A. // *Toxins.* 2020. V. 12.
25. Tuszyński M.H., Armstrong D.M., Gage F.H. // *Brain Res.* 1990. V. 508. P. 241–248.
26. Bishop K.M., Hofer E.K., Mehta A., Ramirez A., Sun L., Tuszyński M., Bartus R.T. // *Exp. Neurol.* 2008. V. 211. P. 574–584.
27. Field R.H., Gossen A., Cunningham C. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. P. 6288–6294.
28. Ramirez J.J., Caldwell J.L., Majure M., Wessner D.R., Klein R.L., Meyer E.M., King M.A. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 2797–2803.
29. Tuszyński M.H. // *Cell Transplant.* 2000. V. 9. P. 629–636.
30. Heisenberg C.P., Cooper J.D., Berke J., Sofroniew M.V. // *Neuroreport.* 1994. V. 5. P. 413–416.
31. Crutcher K.A. // *Auton. Neurosci.* 2002. V. 96. P. 25–32.
32. Scheiderer C.L., McCutchen E., Thacker E.E., Kolasa K., Ward M.K., Parsons D., Harrell L.E., Dobrunz L.E., McMahon L.L. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. P. 3745–3756.
33. Wrenn C.C., Wiley R.G. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1998. V. 16. P. 595–602.
34. Kobayashi S., Ögren S.O., Ebendal T., Olson L. // *Exp. Brain Res.* 1997. V. 116. P. 315–325.
35. Dobryakova Y.V., Volobueva M.N., Manolova A.O., Medvedeva T.M., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V., Markevich V.A., Stepanichev M.Yu., Bolshakov A.P. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13.
36. Volobueva M.N., Dobryakova Y.V., Manolova A.O., Stepanichev M.Yu., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V., Markevich V.A., Bolshakov A.P. // *Neurochem. J.* 2020. V. 14. P. 37–42.
37. Abdulla F.A., Calaminici M.R., Raevsky V.V., Sinden J.D., Gray J.A., Stephenson J.D. // *Exp. Brain Res.* 1994. V. 98. № 3. P. 441–456.
38. Traissard N., Herbeaux K., Cosquer B., Jeltsch H., Ferry B., Galani R., Pernon A., Majchrzak M., Cassel J.C. // *Neuropsychopharmacology.* 2007. V. 32. № 4. P. 851–871.
39. Waite J.J., Chen A.D., Wardlow M.L., Wiley R.G., Lappi D.A., Thal L.J. // *Neuroscience.* 1995. V. 65. № 2. P. 463–476.

Overexpression of Nerve Growth Factor in the Hippocampus Induces Behavioral Changes in Rats with 192IgG-Saporin-Induced Cholinergic Deficit

Yu. V. Dobryakova^a, M. I. Zaichenko^a, Yu. S. Spivak^a,
M. Yu. Stepanichev^a, V. A. Markevich^a, and A. P. Bolshakov^a

^aInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Degeneration of septal cholinergic neurons caused by immunotoxin 192IgG-saporin (SAP) is one of models of pathologies that occur in Alzheimer's disease. We studied whether overexpression of neurotrophic factor (NGF) in the hippocampus, where septal neurons send their projections, may reduce the consequences of this damage. Lentiviral suspension carrying cassette with CMV-NGF-IRES-GFP or CMV-IRES-GFP (control, pCSC) was injected into both hippocampi. Control rats received equivalent amount of PBS instead of SAP and control virus construction PBS-pCSC. Analysis of choline acetyltransferase (ChAT) immunostaining showed that NGF overexpression in the hippocampus did not prevent strong loss of ChAT-positive neurons in the septal area caused by the immunotoxin. In Open Field test, both SAP-NGF and SAP-pCSC-injected rats exhibited hyperactivity; in contrast, in the Y-maze SAP-induced hyperactivity was prevented by NGF overexpression. In the beam walking test, NGF-expressing group of rats showed significant improvement of motor performance. Analysis of the acetylcholine esterase activity in the hippocampi, which we used as a marker of cholinergic function, revealed that level of AChE was increased in SAP-NGF group as compared to SAP-pCSC. In conclusion, our data suggest that NGF overexpression in the hippocampus of rats may partly compensate some 192IgG-saporin-induced impairments related to cholinergic deficit.

Keywords: nerve growth factor, 192IgG-saporin, acetylcholinesterase, behavior

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНАПТИЧЕСКОЙ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

© 2021 г. Н. К. Кличханов¹, А. М. Джафарова¹, *

¹ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, Россия

Поступила в редакцию 05.03.2021 г.

После доработки 12.03.2021 г.

Принята к публикации 16.03.2021 г.

Острая ишемия мозга инициирует каскад реакций, результатом которых может стать развитие окислительного стресса и нарушение сбалансированной работы ряда нейромедиаторных систем мозга. Протекторные эффекты терапевтической гипотермии при ишемии достаточно известны и изучены, однако механизмы ее воздействия на холинэргическую систему мозга, тесно связанную с функционированием ацетилхолинэстеразы (АХЭ), остаются невыясненными. В данной работе исследованы активность и кинетические параметры АХЭ, а также взаимосвязь между каталитическими свойствами фермента и интенсивностью свободно-радикальных процессов в синаптических окончаниях нейронов мозга крыс при окклюзии сонных артерий в условиях нормотермии и умеренной (33°C) гипотермии. Обнаружено, что церебральная ишемия приводит к снижению активности АХЭ, в то время как гипотермия в период окклюзии сонных артерий препятствует этому. При ишемии мозга значение $V_{\max}$ и эффективность катализа АХЭ снижаются, а K_i увеличивается, что на фоне неизменных значений K_m способствует повышению диапазона эффективных концентраций ацетилтиохолина и значений $[S]_{0.5}$. Мягкая гипотермия на фоне ишемии мозга препятствует существенным изменениям кинетических параметров фермента. Ишемия стимулирует процессы окислительной деградации мембранных белков и липидов. Гипотермия во время ишемии предотвращает повышение уровней продуктов окислительной модификации липидов и белков, а также активности супероксиддисмутазы в синапсоммах. Обнаружена отрицательная корреляция между значениями кинетических параметров АХЭ и уровнями продуктов окислительной модификации липидов и белков синапсомом, что указывает на важную роль активных форм кислорода в модуляции активности ключевого фермента холинэргической системы. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что гипотермия во время ишемии предотвращает активацию свободнорадикальных процессов в синаптических окончаниях нейронов, что, в свою очередь, препятствует снижению активности и эффективности катализа АХЭ.

Ключевые слова: субтотальная ишемия, гипотермия, мозг, синаптические мембраны, АХЭ, кинетические параметры, малоновый диальдегид, карбонильные группы, супероксиддисмутаза, каталаза

DOI: 10.31857/S1027813321030080

ВВЕДЕНИЕ

Церебральная ишемия возникает из-за дефицита кровоснабжения мозга, что, в свою очередь, инициирует каскад событий, приводящих к ряду важных клеточных изменений, которые развиваются во времени и в пространстве. Они включают в себя быстрое снижение уровня АТФ, нарушение ионного гомеостаза, избыточное накопление возбуждающих аминокислот, обладающих нейротоксическим действием, дисфункции митохондрий и эндоплазматического ретикула, активация гидролитических ферментов и возрастание активных

форм кислорода (АФК) и азота (АФА), индуцирующих развитие окислительного стресса [1, 2]. Головной мозг особенно уязвим к окислительному повреждению из-за низкого запаса источников энергии, высокого аэробного метаболизма, относительно низкой активности антиоксидантных ферментов, а также высокого содержания субстратов окисления и металлов с переменной валентностью [3, 4]. Исследования последних лет выявили связь между избыточным образованием АФК и развитием гибели нейронов при острой церебральной ишемии [5]. Чрезмерная генерация АФК и АФА может вызывать функциональное и структурное повреждение нейрональных клеток

* Адресат для корреспонденции: 367000 Россия, Республика Дагестан, Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а, e-mail: albi-na19764@mail.ru.

и играть важную роль в патофизиологии церебральной ишемии [6].

Роль окислительного стресса становится более значимой после возобновления кровообращения после периода ишемии, называемого реперфузией, поскольку восстановление кровотока в ишемическом мозге способствует возрастанию парциального давления кислорода в тканях головного мозга. Образуясь при этом $O_2^{\cdot -}$ и $NO^{\cdot}$ принимают непосредственное участие в отсроченной гибели нейронов перинфарктной области [3, 7, 8].

Известно, что устойчивость мозга к дефициту кровоснабжения может повышаться при снижении температуры тела [9]. Основной причиной защитного эффекта гипотермии при ишемических состояниях головного мозга является снижение потребления кислорода и сохранение запасов глюкозы. Гипотермия переводит организм на низкую метаболическую активность, при которой большинство физиологических и патофизиологических процессов находятся на низком уровне. Особенно эффективным является мягкая гипотермия ($33-35^{\circ}C$). Нейропротекторные механизмы гипотермии обычно связывают со снижением скорости обмена веществ и последующего истощения энергии, уменьшением секреции эксайтотоксических нейромедиаторов, предотвращением разрушения гематоэнцефалического барьера и последующего формирования мозгового отека, уменьшением образования свободных кислородных радикалов, подавлением специфических путей гибели клеток [10, 11].

Холинергические нейроны и их проекции широко распространены по всей центральной нервной системе. Их высокая плотность в таламусе, стриатуме, лимбической системе и неокортексе позволяет предположить, что холинергическая передача особенно важна для регулирования таких функций, как обучение, память, корковая организация движения и контроль мозгового кровотока [12, 13]. Ацетилхолинэстераза (АХЭ; КФ 3.1.1.7) является одним из ключевых ферментов этой системы и часто используется в качестве маркера его функционирования. АХЭ представляет собой фермент из группы сериновых эстераз, который осуществляет гидролиз нейромедиатора ацетилхолина (АХ) в холинергических синапсах, обеспечивая прерывистость нервного импульса, ответственного за нейронную связь. Этот фермент широко экспрессируется в мозге и тканях, имеющих холинергическую иннервацию [14, 15]. АХЭ локализована на внешней поверхности синаптических мембран и гидролизует АХ, поступающий в синаптическую щель в ответ на приходящий в терминаль нервный импульс [16]. Следует отметить, что АХЭ вносит существенный вклад в синаптическую передачу не только в холинергических нейронах, но также в дофаминергических и

глутаматергических синапсах [17]. АХЭ присутствует в нейронах в мембраносвязанной и растворимой формах [18].

Установлено, что повреждение нейронов, связанное с ишемией, сопровождается изменением в холинергической системе мозга [19, 20]. Например, после окклюзии средней мозговой артерии обнаружено нарушение функции холинергического пути между лобной корой головного мозга и базальным ядром Мейнерта [21]. Показано, что уровень АХ в ткани мозга изменяется как во время ишемии, так и в постишемическом периоде [22]. По данным различных авторов, активность АХЭ в головном мозге в модели экспериментальной церебральной ишемии снижалась [23–26]. По данным Ванга и сотр. [27], через сутки после 45 мин окклюзии среднемозговой артерии активность АХЭ в коре головного мозга крыс достоверно снижалась. Существенное снижение активности АХЭ мозга было обнаружено через 7 сут после 15 мин окклюзии сонных артерий у крыс [28]. В то же время иммуногистохимические данные свидетельствуют о повышении уровня АХЭ в мозге уже через 0.5 ч после реперфузии, пик увеличения которого достигался через 12 ч реперфузии после окклюзии среднемозговой артерии [29]. Ясно, что на молекулярные события, лежащие в основе вызванных ишемией изменений активности АХЭ, может повлиять использованная модель ишемии, ее характер — является ли окклюзия обратимой или постоянной, а также тяжесть ишемии ткани за период исследования. Несмотря на неоднозначность данных, все эти исследования позволяют предположить, что активность АХЭ может изменяться во время и после ишемического повреждения мозга. Однако в этих работах активность АХЭ исследовалась в гомогенатах мозга, а не на уровне синаптических мембран, где, в основном, и локализуется фермент, мало уделено внимания изменениям ее кинетических характеристик, а также не изучено влияние гипотермии на эти параметры фермента при ишемии.

Целью данной работы является выяснение характера изменения кинетических параметров АХЭ синаптических мембран мозга при ишемии и гипотермии, а также установление связи между активностью фермента и интенсивностью свободнорадикальных процессов в синаптических окончаниях нейронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты выполнены на белых крысах-самцах Вистар, массой 220–230 г, полученных из питомника “Столбовая” ГУ НЦ (г. Чехово). Животных содержали в стандартных условиях вивария Дагестанского государственного университета со свободным доступом к воде и пище при окружающей температуре $22 \pm 1^{\circ}C$ и режимом освещения свет-

темнота 12 : 12 ч. Эксперименты выполнены с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н). Животные были случайным образом разделены на 3 группы по 10 крыс в каждой: 1) контроль (ложно-оперированные животные); 2) ишемия мозга в течение 60 мин; 3) ишемия 60 мин на фоне гипотермии 33°C.

Моделирование неполной ишемии мозга у крыс. Ишемия головного мозга осуществлялась полной перевязкой обеих сонных артерий в течение 60 мин. У животных контрольной группы воспроизводилась наркотизация, кожный разрез и выделение артерий без последующей перевязки сосудов. Все хирургические процедуры проводили под наркозом (внутрибрюшное введение тиопентала натрия в дозе 40–50 мг/кг). В период ишемии температуру тела животного поддерживали на нормальном уровне (37°C), используя тепло настольной лампы.

Условия моделирования гипотермии. Непосредственно перед окклюзией сонных артерий температуру тела животного снижали до 33°C, обкладывая тело животного целлофановым пакетом с мелко колотым льдом. Температуру тела измеряли ректальным цифровым термометром MS6501 (Mastech, Гонконг), датчик которого вводили в прямую кишку на глубину 3–4 см.

Выделение синаптических мембран. После декапитации животного быстро извлекали головной мозг, промывали в ледяном 0.9%-ном растворе NaCl, очищали от мозговых оболочек и выделяли кору больших полушарий мозга. Фракцию синапсом выделяли методом дифференциального центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (AppliChem, Германия) [30]. Мозг гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера в 10-кратном объеме охлажденного (0–4°C) изотонического раствора, содержащего 0.32 М сахарозу, 0.2 мМ ЭДТА (AppliChem, Германия) и 10 мМ трис-HCl (pH 7.4). Полученный гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде гомогенизации и вновь центрифугировали в тех же условиях. Объединенный супернатант центрифугировали при 11500 g в течение 20 мин на центрифуге MR 23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный осадок (грубая митохондриальная фракция) суспендировали в 3 мл 0.32 М сахарозы, наслаивали на градиент сахарозы (0.8 и 1.2 М) и центрифугировали при 100000 g в течение 1 ч на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США). Фракцию синапсом собирали на границе 0.8 и 1.2 М сахарозы. Мембраны синапсом получали после гипоосмотического шока, для чего к осадку синапсом добавляли 3.0 мл холодной бидистиллированной воды и выдерживали их на холоде в течение 1 ч при периодическом перемешивании. Мембраны осаждали

при 32000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость — содержимое синапсом (названную нами в этой работе синаптоплазмой) отбирали и использовали для определения активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Мембраны синапсом дважды промывали в 40 мМ Tris-HCl, pH 7.4, при 32000 g в течение 10 мин. Получившийся осадок синаптических мембран ресуспендировали в 5 мМ Трис HCl-буфере (pH 7.4) и хранили до использования при –70°C. Все процедуры были выполнены при температуре 4°C.

Определение содержания белка. Белок во фракции синаптических мембран определяли по методу Лоури [31].

Определение кинетических характеристик АХЭ. Активность АХЭ определяли методом Элмана с сотр. [32] с ацетилтиохолином (АТХ) (Koch Light, Великобритания) в качестве субстрата. В термостатируемую при 37°C кювету спектрофотометра ПЭ 3000УФ (Шанхай, Китай) вносили 1.45 мл 0.1 М фосфатного буфера, pH 8.0, 0.05 мл суспензии мембран синапсом (40–50 мкг белка) и 0.05 мл 0.01 М раствора 5,5'-дителибис-(2-нитробензойной кислоты) (Koch Light, Великобритания). Реакцию запускали добавлением 0.02 мл раствора АТХ. Изменение оптической плотности раствора в ходе гидролиза АТХ, катализируемой АХЭ, регистрировали при 412 нм в течение 5 мин с интервалом 20 с. Параллельно регистрировали изменение оптической плотности контрольного раствора, в который вместо суспензии мембран вносили соответствующий объем 0.1 М фосфатного буфера. Активность фермента рассчитывали, используя коэффициент молярного поглощения желтого аниона 5-тио-2-нитро-бензоата, который равен $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и выражали в мкмоль/мин мг белка.

Для определения кинетических характеристик АХЭ измеряли зависимость скорости гидролиза от концентрации АТХ в диапазоне 1.56×10^{-5} – 6.4×10^{-2} М. В этих исследованиях использовали 0.036 М фосфатный буфер, pH 8.0. При изменении концентрации АТХ ионную силу реакционной среды поддерживали на уровне 0.1 М путем добавления в пробу соответствующего количества NaCl. При концентрациях АТХ, превышающих 1.0 мМ, ферментативная активность была скорректирована с учетом спонтанного неферментативного гидролиза субстрата.

Особенностью катализа АХЭ является наличие субстратного ингибирования, для объяснения и описания которого были предложены различные кинетические модели [33–35]. В модели, предложенной Стояном с сотр. [33], механизм ингибирования АХЭ зависит от концентрации субстрата: умеренно высокие ($[S] < 100 \text{ мМ}$) или высокие ($[S] > 100 \text{ мМ}$). В настоящем исследовании были

использованы умеренно высокие концентрации субстрата (<64 мМ). Для описания этой модели наиболее приемлемым является уравнение Холдейна–Радича [36]. Однако из-за высокой скорости катализа фермента не всегда удается экспериментально вычислить константы скорости образования и распада всех интермедиатов реакции, особенно когда исследуется не очищенный фермент, а фермент в составе нативных мембран. В этом случае при расчете кинетических характеристик АХЭ целесообразным считают использование упрощенного уравнения Холдейна [34]:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] + [S]^2/K_i}, \quad (1)$$

где v — скорость реакции, $V_{\max}$ — максимальная скорость, K_m — константа Михаэлиса, K_i — константа субстратного ингибирования.

Данное уравнение нами было использовано для расчета кинетических характеристик фермента с помощью многомерного нелинейного регрессионного анализа.

Определение веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в синапсомемах. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) анализировали путем измерения реактивных веществ, реагирующих с ТБК (ТБКРВ), в результате которого измеряется, в основном, образование малонового диальдегида (МДА) [37]. При этом определяли исходный уровень ТБКРВ и их накопление *in vitro* в присутствии инициаторов ПОЛ — Fe^{2+} -аскорбата. Для определения исходного уровня ТБКРВ, к 1.8 мл буферно-солевой среды (БСС), содержащей 132 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л KCl, 1.3 ммоль/л MgCl_2 , 1.2 ммоль/л NaH_2PO_4 , 1.0 ммоль/л CaCl_2 и 10 ммоль/л трис-HCl буфер, pH 7.4, последовательно добавляли 0.2 мл суспензии синапсоме (1–2 мг/мл белка), 1 мл 10%-ной ТХУ (Acros Organics, Бельгия) и 1 мл 0.67%-ной ТБК (Sigma, США). Пробы нагревали до 100°C в течение 15 мин, а затем центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. В супернатанте на спектрофотометре ПЭ 3000УФ (Шанхай, Китай) определяли оптическую плотность при 532 и 560 нм против контрольной пробы, не содержащей суспензию синапсоме. При определении ПОЛ, индуцированного системой Fe^{2+} -аскорбат, к 1.4 мл БСС, добавляли 0.2 мл суспензии синапсоме (1–2 мг/мл белка), 0.2 мл 0.5 мМ аскорбата и 0.2 мл 12 мМ соли Мора ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Пробы инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Дальнейшие измерения проводили как при определении исходного уровня ТБКРВ. Разность оптических плотностей ($E_{532} - E_{560}$) использовали для определения концентрации ТБКРВ, используя коэффициент молярной экстинкции МДА, равный 1.56×10^5 л/М см.

Определение карбонильных групп в белках мембран синапсоме. Содержание карбонильных групп в белках мембран синапсоме измеряли в соответствии с методом, описанным Venditti et al. [38] с некоторыми изменениями. При этом определяли исходный уровень карбонильных групп, а также их накопление под действием генерируемых в среде инкубации оксидантов. Для определения исходного уровня карбонильных групп, 0.2 мл суспензии мембран (2.5 мг/мл белка) смешивали с 0.2 мл 20%-ной ТХУ. Для запуска процессов окислительной модификации белков *in vitro* с образование карбонильных групп, суспензию мембран синапсоме (~2.5 мг/мл белка) инкубировали с 10^{-3} М Fe^{2+} , 10^{-3} М ЭДТА и 3×10^{-4} М H_2O_2 в течение 15 мин при 37°C, после чего смешивали с 0.2 мл 20%-ной ТХУ. Во всех пробах белки осаждали центрифугированием при 1500 g в течение 10 минут. К осадку белков (~0.5 мг белка), после растворения в 100 мкл 0.1 М NaOH, добавляли 1 мл 10 мМ 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) (Sigma, США) в 2 М HCl, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, время от времени встряхивая. В контрольный образец добавляли только 2 М HCl. Затем во все пробы добавляли 20%-ную ТХУ и инкубировали в течение 10 мин на ледяной бане. Затем пробы центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин для осаждения белков. Для удаления непрореагировавших ДНФГ и остатка липидов осажденные белки трижды промывали смесью этанол : этилацетат (1 : 1, об./об.). Конечный осадок белков растворяли в 6 М растворе гуанидин гидрохлорида. Оптическую плотность полученного белкового раствора регистрировали при 370 нм. Определяли разницу в оптической плотности пробы по отношению к контролю и рассчитывали количество карбонильных групп в нмоль на мг белка, используя молярный коэффициент экстинкции $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Определение активности СОД. Суммарную активность СОД в синаптоплазме определяли адrenoхромовым методом, основанным на спонтанном автоокислении адреналина с образованием диформаза, имеющего максимум поглощения при 560 нм [39]. Скорость реакции образования диформаза оценивали по изменению оптической плотности в единицу времени. В опытную пробу вносили 3.67 мл 0.2 М бикарбонатного буфера, pH 9.7, 0.1 мл 2.4 мМ нитросинего тетразолия (НСТ) (Sigma, США), 0.03 мл синаптоплазмы и 0.2 мл 0.1%-ного раствора адреналина. В контрольную пробу добавляли 3.87 мл 0.2 М бикарбонатного буфера (pH 9.7), 0.1 мл 2.4 мМ НСТ и 0.03 мл синаптоплазмы. Количество фермента, которое вызывало 50%-ное ингибирование автоокисления адреналина, принимали за 1 условную единицу (у. е.). Активность СОД была выражена в у. е. на мг белка.

Определение активности каталазы (КАТ). Активность КАТ определяли в синаптоплазме при 37°C с помощью спектрофотометра ПЭ-3000УФ (Шанхай, Китай) по методу Аеби [40]. Синаптоплазма (0.03 мг белка) добавляли к 1 мл реакционной смеси, содержащей 100 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7.4, и 8.8 мМ H₂O₂. Уменьшение поглощения при 240 нм контролировали в течение 3 мин при 37°C. Активность КАТ выражали в мкМ/мин мг белка.

Статистическая обработка. Обработка данных произведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США). Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро–Уилка. Достоверность различий между нормально распределенными данными определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости $p \leq 0.05$. Для оценки взаимосвязи между нормально распределенными переменными был использован корреляционный анализ Пирсона. Данные в таблицах приведены в виде: среднее $\pm$ ошибка среднего. Каждая кривая на графиках концентрационной зависимости скорости гидролиза АТХ – среднее 10-ти независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как видно на рис. 1, график концентрационной зависимости активности АХЭ у контрольных животных имеет характерную колоколообразную форму, т.е. скорость гидролиза растет до определенного оптимального значения концентрации субстрата ($[S]_{\text{опт}}$), затем по мере дальнейшего увеличения концентрации АТХ падает. Таким образом, кинетика ацетилхолинэстеразной реакции характеризуется наличием субстратного ингибирования, что согласуется с литературными данными [35]. Характер концентрационной зависимости активности АХЭ не изменяется при ишемии, а также на фоне гипотермии (рис. 1).

При всех исследованных состояниях наиболее высокая активность АХЭ соответствует концентрации АТХ, приблизительно равной 1 мМ (рис. 1). Абсолютное значение оптимальной

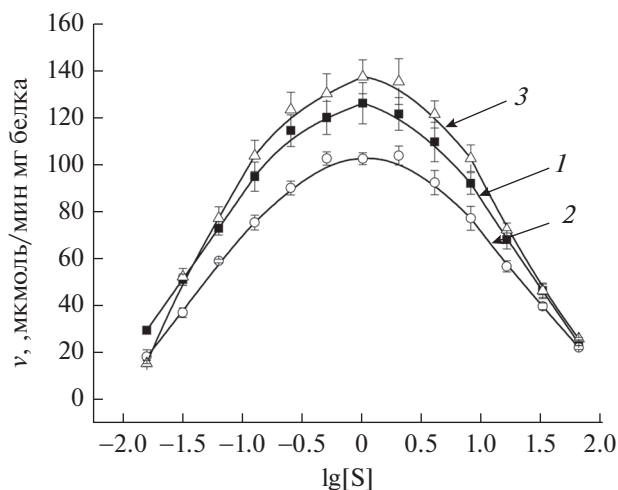


Рис. 1. Концентрационная зависимость активности АХЭ синаптических мембран коры головного мозга крыс: 1 — контроль; 2 — ишемия 60 мин; 3 — ишемия 60 мин на фоне гипотермии 33°C ($n = 10$).

концентрации субстрата ($[S]_{\text{опт}}$), вычисленное из уравнения (2):

$$[S]_{\text{опт}} = \sqrt{K_m K_i} \quad (2)$$

суущественно не отличаются от значений, найденных по графику (табл. 1).

Церебральная ишемия приводит к снижению активности АХЭ при всех исследованных концентрациях субстрата (рис. 1, табл. 1). Так, например, при концентрации субстрата, равной 1 мМ, уменьшение активности АХЭ составляет 18.8% относительно контроля (в контроле 126.16 ± 8.79 мкмоль/мин мг, при ишемии — 102.55 ± 2.54 мкмоль/мин мг; $p < 0.05$). При этом наблюдается незначительное смещение $[S]_{\text{опт}}$, но ее величина достоверно не отличается от значения в контроле (табл. 1).

Снижение температуры тела до 33°C в период окклюзии сонных артерий мозга крыс способствует сохранению активности АХЭ на уровне контроля, а в диапазоне концентраций 1.25×10^{-4} – 0.8×10^{-2} М АТХ-активность фермента становится незначительно выше по сравнению с контролем (рис. 1).

Таблица 1. Кинетические характеристики АХЭ мембран синапсом коры головного мозга крыс при ишемии/реперфузии и гипотермии ($M \pm m$, $n = 10$)

Состояние животного	V_{max} , мкмоль/мин мг белка	K_m , мМ	V_{max}/K_m	K_i , мМ	$[S]_{\text{опт}}$, мМ
Контроль	144.5 ± 8.6	0.063 ± 0.002	2293.6 ± 102.4	12.76 ± 1.02	0.890 ± 0.039
Ишемия 60 мин	$118.7 \pm 3.8^*$	0.069 ± 0.005	$1721.1 \pm 94.5^*$	$15.20 \pm 0.34^*$	1.024 ± 0.063
Ишемия 60 мин + гипотермия	$158.9 \pm 10.7^\#$	0.071 ± 0.003	$2225.3 \pm 154.2^\#$	13.62 ± 0.68	0.983 ± 0.029

Примечание: достоверные различия * — относительно контроля; # — относительно ишемии.

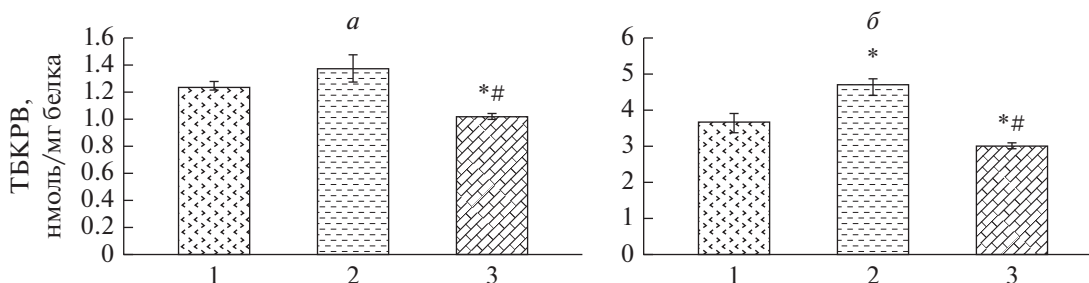


Рис. 2. Содержание ТБКРВ (а) и скорость их накопления в присутствии прооксидантов (б) в синапсомемах из коры головного мозга крыс при ишемии и гипотермии ($n = 10$): 1 – контроль, 2 – ишемия, 3 – ишемия + гипотермия. Достоверные различия: * – относительно контроля, # – относительно ишемии.

Анализ кинетических характеристик АХЭ синаптических мембран мозга показал, что значение $V_{\max}$ при ишемии снижается на 18.1% относительно контроля (табл. 1), а изменения константы Михаэлиса незначительны. Мы рассчитали отношение $V_{\max}/K_m$, которое отражает относительную эффективность катализа при физиологических концентрациях субстрата. Оказалось, что при ишемии эффективность катализа становится на 25% ниже уровня контроля (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что константа ингибирования (K_i), которая является мерой сродства субстрата к периферическому месту связывания, при ишемии увеличивается на 19%, что на фоне неизменных значений K_m способствует повышению диапазона эффективных концентраций АТХ и теоретических значений $[S]_{\text{опт}}$ АХЭ, вычисленных по формуле (2).

Корреляционный анализ показал слабую связь между значениями K_m и K_i при исследованных состояниях животных ($r = 0.59$; $p > 0.05$). С биофизической точки зрения это вполне возможно, так как периферическое место связывания, ответственное за субстратное ингибирование, находится на периферии и никак не связано с активным центром и конформационной динамикой молекулы АХЭ. Достоверное повышение K_i при ишемии свидетельствует об ослаблении прочности тройного комплекса SES в схеме субстратного ингибирования фермента [35].

Мягкая гипотермия на фоне субтотальной ишемии мозга препятствует снижению $V_{\max}$ фермента (табл. 1). При этом значения K_m достоверно не отличаются от контроля, что способствует нормализации уровня эффективности катализа. Кроме того, наблюдается нормализация и таких параметров, как K_i и $[S]_{\text{опт}}$.

АХЭ заякорена в липидной матрице мембраны. Обнаруженные изменения активности и кинетических параметров АХЭ могут быть индуцированы окислительными модификациями молекул как самого фермента, так и белков и липидов в его микроокружении. Для того, чтобы оценить уровень окислительной модификации липидов и белков

мембран синапсом, обусловленный АФК, мы определили количество ТБКРВ и карбонильных групп. Анализ интенсивности ПОЛ в синапсомемах после острой ишемии не выявил изменения исходного уровня ТБКРВ, но установил достоверный рост их накопления в инкубируемых *in vitro* среде Fe^{2+} -аскорбат пробах (рис. 2).

Снижение температуры тела во время ишемии предотвращает активацию процессов перекисидации липидов мембран синапсом. При этом как исходный, так и индуцированный уровень ТБКРВ в синапсомемах снижается не только относительно значений у ишемизированных животных, но и значений контроля. Обнаружена корреляция между кинетическими параметрами АХЭ и содержанием продуктов ПОЛ в синапсомемах. Так, между значениями $V_{\max}$ и уровнями ТБКРВ обнаружены отрицательные корреляции ($r = -0.95$ для исходных и $r = -1$ для индуцированных процессов, $p < 0.05$). Отрицательные корреляции обнаружены также между значениями показателя эффективности катализа АХЭ и ТБКРВ ($r = -0.70$ для исходных и $r = -0.87$ для индуцированных процессов, $p < 0.05$).

АФК и продукты ПОЛ, образующиеся в мозге при ишемии, могут способствовать окислительной модификации отдельных аминокислотных остатков в мембранных белках, что будет сопровождаться глубокими изменениями их структурной организации [41]. Результаты нашего исследования показали, что в белках мембран синапсом при ишемии уровень карбонильных групп на 128% выше по сравнению с контролем (рис. 3). При ишемии, вызванной на фоне гипотермии, уровень карбонильных групп также существенно выше контроля (на 79.6%), но достоверно ниже по сравнению с их уровнем при ишемии. Вместе с тем при ишемии и ишемии на фоне гипотермии в инкубируемых *in vitro* в присутствии оксидантов пробах количество карбонильных групп накапливается значительно меньше по сравнению с контролем. Между кинетическими характеристиками АХЭ и уровнями карбонильных групп обнаружены существенные корреляционные связи. Так,

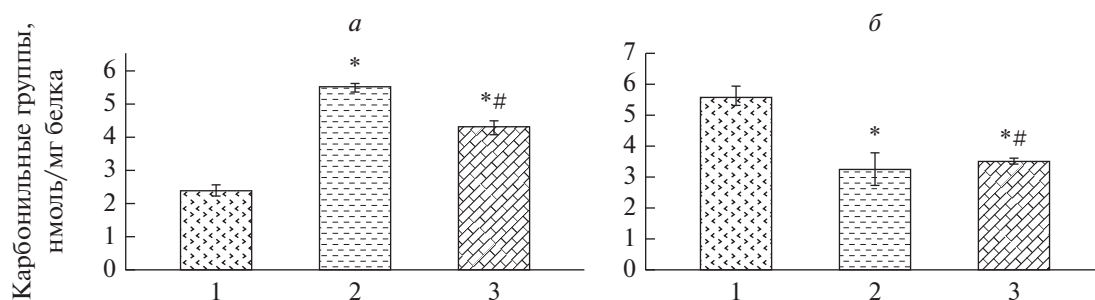


Рис. 3. Содержание карбонильных групп и их прирост за 15 мин в присутствии Fe^{2+} - H_2O_2 в белках мембран при ишемии и гипотермии: 1 – контроль, 2 – ишемия, 3 – ишемия + гипотермия ($n = 10$). Достоверные различия: * – относительно контроля, # – относительно ишемии.

между концентрацией исходных карбонильных групп и значениями $V_{\max}/K_m$, K_i имеет место отрицательная корреляция ($r = -0.85$, $p < 0.05$), а значениями K_i – положительная корреляция ($r = +0.95$, $p < 0.05$).

Интенсификация свободнорадикальных процессов при ишемии может быть связана не только с избыточной генерацией АФК и АФА, реакциями окислительной модификации липидов, но и с изменениями в активности компонентов антиоксидантной системы с последующим смещением окислительно-восстановительного баланса клетки в сторону прооксидантов. Анализ СОД выявил трехкратное повышение ее активности в синаптосомах при ишемии (табл. 2). При этом активность КАТ снижается на 58% относительно контроля, что привело к значительному повышению отношения СОД/КАТ. При ишемии на фоне гипотермии активность СОД остается на уровне контроля, а активность каталазы снижается как при ишемии. В результате отношение СОД/КАТ возрастет в меньшей степени, чем при ишемии. При этом между активностью СОД и уровнями МДА обнаружена положительная корреляция ($r = +0.82$, $p < 0.05$ для исходного уровня и $r = +0.95$, $p < 0.05$ для индуцированного). Положительная корреляция обнаружена также между активностью СОД, отношением СОД/КАТ и уровнями карбонильных групп ($r = +0.74$ и $r = +0.86$).

Между кинетическими параметрами АХЭ и активностью антиоксидантных ферментов синапсом также имеют место высокие уровни корреляции. Так, коэффициенты корреляции

между $V_{\max}$, $V_{\max}/K_m$, K_i и отношением СОД/КАТ составляют -0.9 ($p < 0.05$), -1 ($p < 0.05$) и $+1$ ($p < 0.05$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что церебральная ишемия существенно влияет на активность и кинетические характеристики АХЭ мембран синаптических окончаний нейронов. Снижение температуры тела в период окклюзии сонных артерий мозга крыс предотвращает изменение активности и кинетических характеристик фермента.

Обнаруженные разнонаправленные изменения активности АХЭ при ишемии и ишемии–гипотермии обусловлены модуляциями механизмов функционирования фермента, чувствительными индикаторами которых являются кинетические характеристики. Исследование показало, что снижение эффективности катализа АХЭ при ишемии происходит исключительно за счет $V_{\max}$, поскольку значения K_m при этом не изменяются. Известно, что изменение $V_{\max}$ может происходить за счет изменения концентрации фермента или же его каталитической константы, в соответствии с уравнением:

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E],$$

где k_{cat} – каталитическая константа (константа скорости образования продукта реакции), $[E]$ – концентрация фермента.

Таблица 2. Активность СОД и КАТ в синаптосомах из коры головного мозга крыс при ишемии и гипотермии ($M \pm m$, $n = 10$)

Состояние животного	СОД, усл. ед./мг белка	КАТ, мкмоль/мин мг белка	СОД/КАТ
Ложная операция	2.79 ± 0.16	0.99 ± 0.01	2.81 ± 0.17
Ишемия 60 мин	$8.36 \pm 0.54^*$	$0.42 \pm 0.02^*$	$19.9 \pm 1.39^*$
Ишемия 60 мин + гипотермия	$2.24 \pm 0.24^\#$	$0.43 \pm 0.03^*$	$5.21 \pm 0.39^{* \#}$

Примечание: достоверные различия * – относительно контроля; # – относительно ишемии.

Концентрация фермента в клетке определяется балансом между его биосинтезом и деградацией.

Известно, что АХЭ кодируется одним геном, но может существовать в нескольких молекулярных формах [42]. Соотношения молекулярных форм определяются их тканевым, клеточным и субклеточным распределением и изменяются соответственно развитию или патогенетическому состоянию данных тканей. У позвоночных 3'-конец пре-мРНК АСhЕ альтернативно сплайсирован для генерации трех разных изоформ, которые несут идентичный каталитический домен, но различный С-терминальный конец. В мозге экспрессируются две изформы: тетрамерная АСhЕТ, которая закрепляется на богатый пролином якорь мембраны PRiMA [42], и растворимая мономерная форма АСhЕР, синтез которой активируется при остром физиологическом стрессе в мозге [43].

В работе [24] было установлено, что содержание АХЭ в мозге при ишемии существенно снижается. Поскольку ишемия сопровождается развитием стрессорной реакции, гипотетически она может снизить концентрацию АХЭ в синаптической мембране за счет модуляции альтернативного сплайсинга, в частности, переключения синтеза АСhЕТ на АСhЕР.

Установлено, что при глобальной ишемии существенно подавляется синтез белков в мозге [44], поэтому высказано предположение [24], что снижение содержания АХЭ в мозге при ишемии связано с подавлением экспрессии фермента.

Действительно, при ишемии снижение содержание АХЭ в синаптических мембранах может зависеть и от скорости синтеза фермента. Известно, что АХЭ сначала синтезируется в виде каталитически неактивной молекулы, которая затем быстро созревает в каталитически активную форму. Однако большая часть неактивного фермента остается в этой незрелой форме. Эти молекулы имеют очень короткую продолжительность жизни и разрушаются за счет деградации, связанной с эндоплазматическим ретикуломом с периодом полураспада около 45 минут. Молекулы, созревшие до каталитически активных форм, являются промежуточными между вновь синтезированным каталитически неактивным ферментом и полностью зрелыми и стабильными олигомерными формами. Эти формы способны стабилизироваться прямым взаимодействием с некаталитическими субъединицами PRiMA [45]. Следовательно, экспрессия PRiMA тоже является ключевым фактором в организации G4 АХЭ и нацеливании ее на клеточную мембрану [46]. Однако в нашем случае моделирование ишемии производилось за достаточно короткий промежуток времени (1 ч), что может

оказаться недостаточным для того, чтобы существенно изменить концентрацию АХЭ в синаптической мембране, поскольку период полужизни АХЭ в мозге взрослой крысы составляет 2.84 ± 0.13 дней [47].

Снижение концентрации АХЭ при церебральной ишемии могло происходить, вследствие деградации мембраносвязанного фермента в результате его протеолиза. Известно, что мембранные белки деградируют либо посредством эндолизосомного механизма, либо аутофагии [48, 49]. Гу и сотр. [50] с помощью трансмиссионного электронного микроскопа через 4 часа после ишемического повреждения головного мозга обнаружили в нейронах заметное накопление аутофагических тел и лизосом аутофагии.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при ишемии активность и каталитические характеристики АХЭ коррелируют с уровнем продуктов окислительной модификации белков и липидов мембран синапсом. Это указывает на то, что окислительный стресс может способствовать снижению активности АХЭ при ишемии. Считается, что АФК играет важную роль в развитии окислительного стресса, вызывающего повреждение клеток мозга во время ишемии. АФК в синаптических окончаниях нейронов могут образоваться преимущественно при нарушении дыхательной цепи митохондрий [51], при функционировании моноаминоксидазы [52], а также поступать из активированной микроглии [53]. O_2^- , поступающий из этих источников, конвертируется (преобразовывается) с помощью СОД в H_2O_2 , которая затем превращается в безвредные H_2O и O_2 под действием КАТ. СОД и КАТ являются ключевыми антиоксидантными ферментами, играющими жизненно важную роль в устранении АФК. Некоторые исследования показали, что активность СОД при церебральной ишемии увеличилась непропорционально изменению активности КАТ [54, 55]. В нашем исследовании также обнаружен существенный дисбаланс в работе этих ферментов в синапсоммах при ишемии. Различия в модуляции активности СОД и КАТ при ишемии могут происходить по различным причинам. Активность СОД увеличивается, вероятно, как реакция на окислительный стресс, вызванный ишемией. Активация СОД во время ишемии может быть компенсаторной реакцией на перепроизводство O_2^- [56]. Кроме того, повышение уровня интерлейкина-1 (ИЛ-1) [55], фактора некроза опухолей (TNF) и липополисахаридов [57] во время ишемии также может активировать СОД [58]. В отличие от СОД, избыток O_2^- или H_2O_2 может вызывать повреждения активного центра КАТ, что

приводит к инаktivации фермента [59]. Дисбаланс между СОД и КАТ может привести к накоплению чрезмерного количества H_2O_2 в синаптических окончаниях нейронов. По данным микродиализного исследования Лей и др. [60], базальный уровень H_2O_2 в гиппокампе песчанок составлял примерно 1 мкМ. В стриатуме реперфузируемого мозга крыс после ишемического инсульта концентрация H_2O_2 достигала 100 мкМ [61].

Данилович [62] на сарколемме миомерия свиньи показал, что H_2O_2 в физиологических концентрациях (от 1.6 до 6.4 мкМ) способен ингибировать АХЭ. В присутствии дитиотреитола ингибиторный эффект H_2O_2 частично снижался, что, по мнению автора, свидетельствует о вовлеченности тиоловых групп в ингибирование фермента. Накопление H_2O_2 в миллимолярном диапазоне концентраций может снижать экспрессию эпидермальной АХЭ и ингибировать активность рекомбинантной АХЭ человека [63, 64], а также растворимой и мембраносвязанной АХЭ эритроцитов человека [65].

H_2O_2 является мягким окислителем, способным окислять тиоловые группы белков, однако в присутствии металлов переменной валентности пероксид водорода может образовать $\cdot OH$ в реакции Фентона. Было подтверждено, что $\cdot OH$ ингибирует АХЭ мозга крысы и активность рекомбинантной АХЭ человека [66]. Кинетический анализ с использованием очищенной рекомбинантной АХЭ человека и молекулярное моделирование трехмерной структуры человеческого АХЭ подтвердили, что АФК-опосредованное окисление Trp432, Trp435 и Met436 вызывает перемещение и дезориентацию His440 в активном центре АХЭ и, как результат, дезактивацию белка [63, 64].

Известно, что ПОЛ может изменить физиологические функции клеточных мембран, модифицируя такие свойства мембранного бислоя, как мембранный потенциал, текучесть, проницаемость для различных веществ и/или посттрансляционные химические модификации [67, 68]. При окислительном стрессе изменения в липидной матрице мембраны могут быть решающим фактором в модификации конформационного состояния некоторых молекул, в том числе АХЭ [69]. Хотя уровень ТБКРВ в синапсоммах при ишемии не изменяется, достоверно увеличивается их накопление при генерации радикалов в условиях *in vitro*. Это говорит о повышении доступности жирнокислотных остатков фосфолипидов для оксидантов в условиях ишемии из-за нарушений структуры липидного бислоя.

То, что АФК ответственны за ингибирование АХЭ, свидетельствуют данные, полученные при гипотермии. Результаты наших исследований по-

казали, что гипотермия, вызванная во время ишемии, не только предотвращает снижение активности и изменение кинетических характеристик АХЭ, но одновременно снижает уровень продуктов окислительной модификации белков и липидов и дисбаланс антиоксидантных ферментов синапсомом. Ранее Лей и коллеги [70] обнаружили, что гипотермия (30–32°C) снижает ПОЛ в мозге после глобальной ишемии. В последующем было установлено, что умеренная гипотермия, моделируемая во время ишемии, снижает уровни NO и $\cdot OH$ после глобальной и фокальной церебральной ишемии [71, 72]. Снижение температуры тела крыс до 33°C при ишемии мозга, вызванной окклюзией среднелозговой артерии, способствовало значительному уменьшению образования супероксид-аниона как в преинфарктной зоне, так и контралатеральной области [73]. Эти данные позволяют с уверенностью предположить, что умеренная гипотермия, снижая генерацию АФК и АФА, предотвращает изменение активности и кинетических характеристик АХЭ мембран синапсомом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе новые данные, во-первых, свидетельствуют, что острая церебральная субтотальная ишемия снижает активность и эффективность катализа АХЭ синаптических мембран мозга крыс, главным образом посредством снижения V_{max} . Во-вторых, впервые продемонстрировано, что мягкая гипотермия на фоне ишемии предотвращает изменения кинетических констант (V_{max} и K_i), в результате чего эффективность катализа АХЭ сохраняется на уровне контроля. Установлено, что при церебральной ишемии существенно увеличивается уровень маркеров окислительной модификации белков и липидов мембран синапсомом, происходит дисбаланс ключевых антиоксидантных ферментов. Гипотермия на фоне ишемии препятствует развитию окислительного стресса в синапсоммах. Полученные результаты вносят вклад в понимание участия АФК в модуляции активности синаптической АХЭ при ишемии мозга и путей защиты фермента при умеренной гипотермии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена без внешней финансовой поддержки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и (или) институциональные

принципы ухода и использования животных, нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях) были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lin L, Wang X, Yu Z. // *Biochem. Pharmacol.* 2016. V. 5. № 4. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000213>
2. Awooda H.A. // *J. Biosci. Med.* 2019. V. 7. P. 20–28.
3. Chan P.H. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001. V. 21. P. 2–14.
4. Sayre L.M., Perry G., Smith M.A. // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. V. 21. № 1. P. 172–188.
5. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007. V. 39. P. 44–84.
6. Awooda H.A., Lutfi M.F., Saeed A.M. // *Int. J. Health Sci.* 2015. V. 9. P. 17–24.
7. Chen H., Yoshioka H., Kim G.S., Jung J.E., Okami N., Sakata H., Chan P.H. // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 8. P. 1505–1517.
8. Sun M.S., Jin H., Sun X., Huang S., Zhang F.L., Guo Z.N., Yang, Y. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3804979>
9. van der Worp H.B., Macleod M.R., Kollmar R. // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2010. V. 30. P. 1079–1093.
10. Olsen T.S., Weber U.J., Kammergaard L.P. // *The Lancet Neurology.* 2003. V. 2. № 7. P. 410–416.
11. Sun Y.-J., Zhang Z.-Y., Fan B., Li G.-Y. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. Article 586. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00586>
12. Schliebs R., Arendt T. // *J. Neural Transm.* 2006. V. 113. № 11. P. 1625–1644.
13. Solari N., Hangya B. // *Eur. J. Neurosci.* 2018. V. 48. № 5. P. 2199–2230.
14. Taylor P. // *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics* / Ed.: Brunton L. N.Y.: McGraw-Hill, 2006. P. 201–217.
15. Orta-Salazar E., Cuellar-Lemus C.A., Díaz-Cintra S., Fera-Velasco A.I. // *Neurología.* 2014. V. 29. № 8. P. 497–503.
16. Hicks D., John D., Makova N.Z., Henderson Z., Nalivaeva N.N., Turner A.J. // *J. Neurochem.* 2011. V. 116. № 5. P. 742–746.
17. Zimmerman G., Soreq H. // *Cell Tiss. Res.* 2006. V. 326. № 2. P. 655–669.
18. Thullbery M.D., Cox H.D., Schule T., Thompson C.M., George K.M. // *J. Cell Biochem.* 2005. V. 96. № 3. P. 599–610.
19. Sakuma M., Hyakawa N., Kato H., Araki T. // *J. Neural Trans.* 2008. V. 115. № 3. P. 413–422.
20. Katsuki H., Matsumoto K. // *Nicotinic acetylcholine receptor signaling in neuroprotection* / Ed.: Akaike A., Shimohama S., Misu Y. Singapore: Springer, 2018. P. 113–136.
21. Kataoka K., Hayakawa T., Kuroda R., Yuguchi T., Yamada K. // *Stroke.* 1991. V. 22. P. 1291–1296.
22. Beley A., Bertrand N., Beley P. // *Neurochem. Res.* 1991. V. 16. № 5. P. 555–561.
23. Malatová Z., Gottlieb M., Marsala J. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1999. V. 18. № 1. P. 57–71.
24. Saez-Valero J., Gonzalez-Garcia C., Cena V. // *Mol. Brain Res.* 2003. V. 117. P. 240–244.
25. Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К. // *Изв. Даг. гос. пед. ун-та. Естеств. и точн. науки.* 2010. № 2. С. 69–73.
26. Ojo O.B., Amoo Z.A., Saliu I.O., Olaleye M.T., Farombi E.O., Akinmoladun A.C. // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 111. P. 859–872.
27. Wang Z.-F., Wang J., Zhang H.Y., Tang X.C. // *J. Neurochem.* 2008. V. 106. P. 1594–1603.
28. Deb B., Sreenath C., Kumar M.S., Elango K. // *J. Appl. Pharm. Sci.* 2012. V. 2. № 3. P. 106–111.
29. Hu T., Fu Q., Liu X., Zhang H., Dong M. // *J. Neuroimmunol.* 2009. V. 211. P. 84–91.
30. Lapetina E.G., Soto E.F., De Robertis E. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1967. V. 135. P. 33–43.
31. Lowry D.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
32. Ellman Y.L., Courtney K.D., Andres V.J., Featherstone R.M. // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 7. № 1. P. 88–95.
33. Stojan J., Brochier L., Alies C., Colletier J.P., Fournier D. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 1364–1371.
34. Reed M.C., Lieb A., Nijhout H.F. // *Bioessays.* 2010. V. 32. P. 422–429.
35. Rosenberry T.L. // *J. Mol. Neurosci.* 2010. V. 40. P. 32–39.
36. Putz M.V. // *Molecules.* 2011. V. 16. P. 3128–3145.
37. Лысакова Т.И., Аксентьев С.Л., Федорович С.В., Левко А.В., Ракович А.А., Самойленко С.Г., Федюлов А.С., Конев С.В. // *Биофизика.* 1997. Т. 42. Вып. 2. С. 408–411.
38. Venditti P., Rosa R.D., Meo S.D. // *Free Rad. Biol. Med.* 2004. V. 36. № 3. P. 348–358.
39. Сирота Т.В. // *Биомед. химия.* 2013. Т. 59. № 4. С. 399–410.
40. Aebi H. // *Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press. 1974. P. 673–684.
41. Дубинина Е.Е. // *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение: монография.* С.-Петербург, 2006. 400 с.
42. Massoulie J. // *Neurosignals.* 2002. V. 11. P. 130–143.
43. Meshorer E., Soreq H. // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. № 4. P. 216–224.
44. Bodsch W., Takahashi K., Barbier A., Ophoff B.G., Hossman K.A. // *Prog. Brain Res.* 1985. V. 63. P. 197–210.
45. Rotundo R.L. // *J. Neurochem.* 2017. V. 142. P. 52–58.
46. Chen V.P., Choi R.C., Chan W.K., Leung K.W., Guo A.J., Chan G.K., Tsim, K.W. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 38. P. 32948–32961.
47. Wenthold R.J., Mahler H.R., Moore, W.J. // *J. Neurochem.* 1974. V. 22. № 6. P. 941–943.
48. Huber L.A., Teis D. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2016. V. 39. P. 8–14.
49. Galluzzi L., Baehrecke E.H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J.M., Cecconi F., Kroemer G. // *EMBO J.* 2017. V. 36. № 13. P. 1811–1836.
50. Gu Z., Sun Y., Liu K., Wang F., Zhang T., Li Q., Sun X. // *Neural Reg. Res.* 2013. V. 8. № 23. P. 2117–2125.
51. Starkov A. A., Chinopoulos C., Fiskum G. // *Cell Calcium.* 2004. V. 36. № 3–4. P. 257–264.

52. *Seif-El-Nasr M., Atia A.S., Abdelsalam R.M.* // *Arzneimittelforschung*. 2008. V. 58. № 4. P. 160–167.
53. *Weinstein J.R., Koerner I.P., Möller T.* // *Future Neurol*. 2010. V. 5. № 2. P. 227–246.
54. *Işlekel S., Işlekel H., Güner G., Özdamar N.* // *Res. Exp. Med*. 1999. V. 199. № 3. P. 167–176.
55. *Девятков А.А., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Рыжков И.Н., Ругер Н.А., Тутельян В.А.* // *Биомед. химия*. 2018. V. 64. № 4. P. 344–348.
56. *Maier C.M., Sun G.H., Cheng D., Yenari M.A., Chan P.H., Steinberg G.K.* // *Neurobiol. Dis*. 2002. V. 11. № 1. P. 28–42.
57. *Al-Amin M.M., Choudhury M.F.R., Chowdhury A.S., Chowdhury T.R., Jain P., Kazi M., Alkholief M., Alshehri S.M., Reza H.M.* // *Front. Neurosci*. 2018. V. 12. P. 384.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00384>
58. *Marikovsky M., Ziv V., Nevo N., Harris-Cerruti C., Mahler O.* // *J. Immunol*. 2003. 170. № 6. P. 2993–3001.
59. *Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Remacle J.* // *Mech. Ageing Dev*. 1990. V. 51. № 3. P. 283–297.
60. *Lei B., Adachi N., Arai T.* // *Brain Res. Prot*. 1998. V. 3. № 1. P. 33–36.
61. *Hyslop P.A., Zhang Z., Pearson D.V., Phebus L.A.* // *Brain Res*. 1995. V. 671. P. 181–186.
62. *Danylovykh Iu.V.* // *Ukr. Biokhim. Zh*. 2009. V. 81. № 4. P. 32–38.
63. *Schallreuter K.U., Elwary S.M.A., Gibbons N.C.J., Rokos H., Wood J.M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. V. 315. № 2. P. 502–508.
64. *Schallreuter K.U., Elwary S.* // *Life Sci*. 2007. V. 80. № 24–25. P. 2221–2226.
65. *Молочкина Е.М., Озерова И.Б.* // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2003. Т. 43. № 3. С. 294–300.
66. *Méndez-Garrido A., Hernández-Rodríguez M., Zamora-Ulloa R., Correa-Basurto J., Mendieta-Wejebe J.E., Ramírez-Rosales D., Rosales-Hernández M.C.* // *Neurochem. Res*. 2014. V. 39. № 11. P. 2093–2104.
67. *Catalá A., Díaz M.* // *Front. Physiol*. 2016. V. 7. P. 423.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00423>
68. *Gaschler M.M., Stockwell B.R.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2017. V. 482. № 3. P. 419–425.
69. *Gonçalves J.F., Fiorenza A.M., Spanevello R.M., Mazanti C.M., Bochi G.V., Antes F.G., Schetinger M.R.C.* // *Chem.-Biol. Interact*. 2010. 186. № 1. P. 53–60.
70. *Lei B., Tan X., Cai H., Xu Q., Guo Q.* // *Stroke*. 1994. V. 25. P. 147–152.
71. *Kil H.Y., Zhang J., Piantadosi C.A.* // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1996. V. 16. P. 100–106.
72. *Kumura E., Yoshimine T., Takaoka M., Hayakawa T., Shiga T., Kosaka H.* // *Neurosci. Lett*. 1996. V. 220. P. 45–48.
73. *Maier C.M., Sun G.H., Cheng D., Yenari M.A., Chan P.H., Steinberg G.K.* // *Neurobiol. Dis*. 2002. V. 11. № 1. P. 28–42.

Effect of Mild Hypothermia on the Catalytic Characteristics of Synaptic Acetylcholinesterase during Incomplete Global Cerebral Ischemia in Rats

N. K. Klichkhanov^a and A. M. Dzhaferova^a

^aDaghestan State University, Makhachkala, Russia

Acute cerebral ischemia initiates a cascade of reactions that can result in the development of oxidative stress and disruption of the balanced functioning of a number of neurotransmitter systems in the brain. The protective effects of therapeutic hypothermia in ischemia are well known and studied, however, the mechanisms of its effect on the cholinergic system of the brain, closely related to the functioning of acetylcholinesterase (AChE), remain unclear. In this work, the activity and kinetic parameters of AChE, as well as the relationship between the catalytic properties of the enzyme and the intensity of free radical processes in the synaptic terminals of neurons in the rat brain with occlusion of the carotid arteries in conditions of normothermia and moderate (33°C) hypothermia were investigated. It was found that cerebral ischemia leads to a decrease in AChE activity, while hypothermia during the period of carotid artery occlusion prevents this. In cerebral ischemia, the $V_{\max}$ value and the efficiency of AChE catalysis decrease, and K_i increases. This against the background of unchanged K_m values contributes to an increase in the range of effective acetylthiocholine concentrations and $[S]_{\text{opt}}$ values. Mild hypothermia against the background of cerebral ischemia prevents significant changes in the kinetic parameters of the enzyme. Ischemia stimulates the processes of oxidative destruction of membrane proteins and lipids, significantly increases the superoxide dismutase (SOD) activity and the SOD/catalase ratio in synaptosomes. Hypothermia during ischemia prevents an increase in level of lipid and protein oxidative modification products, as well as superoxide dismutase activity in synaptosomes. A negative correlation was found between the kinetic parameters of AChE and the levels of products of oxidative modification of lipids and proteins of synaptosomes. This indicates an important role of reactive oxygen species in modulating the activity of a key enzyme of the cholinergic system. The results obtained allow us to conclude that hypothermia during ischemia prevents the activation of free radical processes in the synaptic endings of neurons, which, in turn, prevents a decrease in the activity and efficiency of AChE catalysis.

Keywords: subtotal ischemia, hypothermia, brain, synaptic membranes, AChE, kinetic parameters, malondialdehyde, carbonyl groups, superoxide dismutase, catalase

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577

НЕОДНОЗНАЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИЕМА ТС-2153 – ИНГИБИТОРА СТРИАТУМСПЕЦИФИЧНОЙ ПРОТЕИНТИРОЗИНФОСФАТАЗЫ STEP – НА МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2021 г. Е. А. Рудницкая¹, А. О. Бурняшева¹, Т. А. Козлова¹, Н. А. Муралева¹, Д. В. Телегина¹,
Т. М. Хоменко², К. П. Волчо², Н. Ф. Салахутдинов², Н. Г. Колосова^{1, *}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 19.03.2021 г.

После доработки 24.03.2021 г.

Принята к публикации 29.03.2021 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) — неизлечимое заболевание, которое становится основной причиной сенильной деменции. Попытки создания лекарств, нацеленных на подавление накопления амилоида- β , оказались неэффективными, в связи с чем активно ведется поиск новых терапевтических подходов, направленных на другие звенья патогенеза БА. Одним из них — подавление активности стриатумспецифичной протеинтирозинфосфатазы (STEP), которая повышена в коре головного мозга пациентов с БА. Целью настоящего исследования явилась оценка влияния длительного приема ингибитора STEP ТС-2153 на прогрессию признаков БА у крыс OXYS — модели спорадической формы заболевания. ТС-2153 неоднозначно повлиял на поведение животных: значительно снизил и исходно пониженную моторно-исследовательскую активность и усилил тревожное поведение у крыс OXYS, но улучшил их долговременную память в водном лабиринте Морриса. При этом ТС-2153 не повлиял на усиленное у крыс OXYS накопление амилоида- β , а также на уровень белка STEP61, который в коре и гиппокампе крыс OXYS был таким же, как у контрольных крыс Вистар. Такие результаты предполагают, что эффекты длительного приема ТС-2153 могут быть опосредованы механизмами, не связанными со STEP. В частности, ТС-2153 может действовать как потенциальный донор сероводорода и таким образом существенно влиять на окислительно-восстановительный гомеостаз.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза STEP, ингибитор STEP, ТС-2153, крысы OXYS

DOI: 10.31857/S1027813321030109

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) — неизлечимое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание людей старшего возраста, которое становится основной причиной сенильной деменции [1, 2]. Клинически БА проявляется дефицитом памяти, изменениями личности и депрессией, нарушени-

ем когнитивных функций, утратой способности ориентироваться в обстановке и ухаживать за собой. Патогенез БА характеризуется усиленным образованием амилоидных бляшек, гиперфосфорилированием тау-белка, митохондриальной дисфункцией, окислительным стрессом и дефицитом ацетилхолина [3]. Несмотря на то, что в доклинических исследованиях регулярно выявляются перспективные лекарственные препараты для лечения БА, клинические испытания, как правило, не подтверждают их эффективность [4]. В значительной степени это обусловлено тем, что в течение последних трех десятилетий центральное место в поисках эффективных методов лечения занимали подходы, нацеленные на пути, связанные с накоплением β -амилоида (А β). Однако ни один из нацеленных на А β препаратов при клинических испытаниях не проявил ощутимую терапевтическую эффективность. Учитывая сложность

Принятые сокращения: А β — β -амилоид; БА — болезнь Альцгеймера; ВМД — возрастная макулярная дегенерация; AMPAR — рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты; APP — белок предшественник β -амилоида; BDNF — нейротрофический фактор мозга; LTD — долговременная депрессия; LTP — долговременная потенция; NMDAR — рецептор N-метил-D-аспартата; STEP — стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза; ТС-2153 — гидрохлорид 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиопин-6-амин.

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10; тел.: +7(383) 363-49-80; e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru.

патогенеза этого комплексного многофакторного заболевания, в настоящее время ведется активный поиск альтернативных подходов к лечению БА. После обнаружения в префронтальной коре головного мозга пациентов с БА и на мышинных моделях заболевания повышенной активности стриатумспецифичной протеинтирозинфосфатазы (STEP), модуляция уровней STEP или подавление ее активности рассматривается как один из перспективных подходов к разработке новых способов лечения БА [5, 6].

Семейство протеинтирозинфосфатаз STEP представлено как цитозольными (STEP46), так и ассоциированными с мембранами (STEP61) белками, которые кодируются одним геном *PTPN5* и образуются путем альтернативного сплайсинга [7]. *PTPN5* экспрессируется преимущественно в нейронах базальных ганглиев, гиппокампа, коры головного мозга и родственных структурах [8]. STEP61 модулирует функции синапсов и пластичность, регулируя трафик рецепторов глутамата — N-метил-D-аспартата (NMDAR) и α -амино-3-гидроксис-5-метил-4-изоксазолепропионовой кислоты (AMPA), а также активность ERK1/2, p38, Fyn и Pyk2.

Активность STEP61 регулируют несколько путей, в том числе — сигнальные каскады глутамата, дофамина и нейротрофического фактора мозга (BDNF), изменения которых регистрируются при развитии БА. Недавние исследования показали, что A β влияет на STEP — его накопление приводит к повышению ее уровня и активности, что, в свою очередь, нарушает доставку глутаматных рецепторов к нейрональной мембране и от нее [6, 9]. Считается, что STEP противодействует развитию долговременной потенциации (LTP) и ограничивает долговременную память [10]. A β усиливает долговременную депрессию (LTD) в области зубчатой извилины гиппокампа, активируя при этом STEP [11]. Таким образом, как высокие, так и низкие уровни STEP нарушают функции синапсов и способствуют нарушениям поведения и обучения. С повышением уровня и активности STEP связывают снижение когнитивных функций при старении: такие изменения были выявлены в гиппокампе старых мышей и крыс с дефицитом памяти, у старых макаков-резусов и людей с умеренными когнитивными расстройствами, вызванными амнезией [12]. Высокие уровни STEP, помимо людей с БА, выявляются в посмертных образцах пациентов с болезнью Паркинсона и шизофренией, а также в моделях на животных с синдромом ломкой Х-хромосомы [13–15]. При этом при ряде других патологических состояний, включая ишемию, хорею Хантингтона, злоупотребление алкоголем и стрессовые расстройства выявляется пониженный уровень активности STEP [6].

Показано, что генетическое снижение уровня STEP [16] или фармакологическое ингибирование ее активности [5] способны улучшить память у грызунов — моделей БА [12]. Было установлено, что специфическим ингибитором STEP является гидрохлорид 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин (известный как ТС-2153), который образует обратимую ковалентную связь с цистеином в каталитическом центре STEP [5]. Впервые это соединение было синтезировано в Новосибирском институте органической химии [17] и представлено Куликовым и его коллегами в качестве антидепрессанта [18]. Позднее было показано [5], что кратковременное воздействие ТС-2153 восстанавливает когнитивные нарушения и дефицит памяти у трансгенных мышей — модели ранней формы БА (мыши 3xTg-AD), но при этом не влияет на уровень A β и тау протеина в мозге этих животных. Такие результаты подтвердили то, что STEP является потенциальной терапевтической мишенью при БА. Профилактика и лечение БА предполагают продолжительное воздействие препаратов, однако эффекты длительного подавления STEP с помощью ТС-2153 ранее не изучались. Это определяет актуальность исследования долгосрочных эффектов ингибирования STEP на состояние когнитивных функций на различных биологических моделях БА, прежде всего, — на моделях наиболее распространенной (>95% случаев) спорадической формы этого заболевания.

В настоящем исследовании мы оценили эффекты длительного приема ТС-2153 на крысах линии OXYS — уникальной генетической модели преждевременного старения, одним из проявлений которого становится развитие признаков БА [19–22]. При отсутствии в геноме мутаций, специфичных для ранней (семейной) формы БА, у крыс OXYS спонтанно развиваются все основные признаки и воспроизводятся стадии заболевания [19]. Поведенческие изменения, дефицит памяти и снижение способности к обучению у крыс OXYS регистрируются в возрасте 3–5 мес. одновременно с первыми признаками нейродегенерации: нарушением синапсов, гибелью нейронов, дисфункцией митохондрий и гиперфосфорилированием тау-белка в гиппокампе и коре головного мозга. С возрастом у крыс OXYS нейродегенеративные изменения усиливаются и сопровождаются избыточной продукцией белка-предшественника амилоида (APP), накоплением к 12 мес. пептида A β и связанными с ним ярко выраженными патологическими изменениями к возрасту 18 мес. [19, 23]. Недавно мы показали, что развитие признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне активации сигнального пути p38 MAPK [24]. Поскольку STEP регулирует этот путь, действуя как фосфатаза p38, можно ожидать изменений ее активности в мозге крыс OXYS. Целью настоящей работы

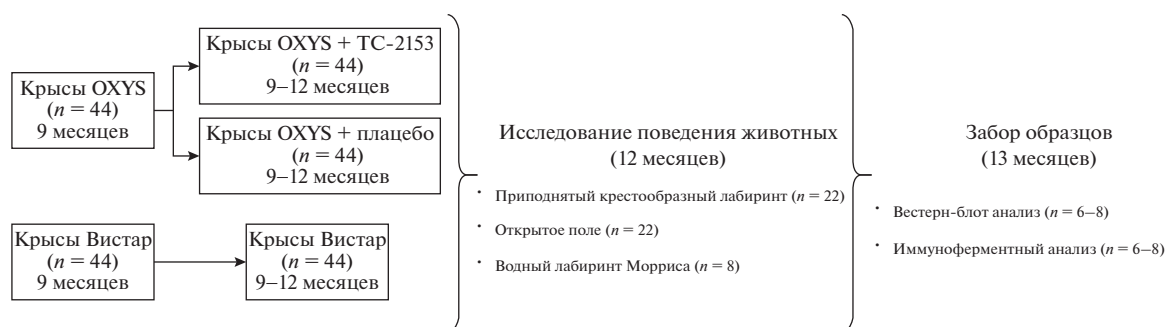


Рис. 1. Схема эксперимента.

было исследование воздействия ТС-2153 на развитие у крыс OXYS признаков БА в период их активной прогрессии — в возрастной период от 9 до 13 мес. Оценивали поведенческие проявления БА и накопление Аβ в коре и гиппокампе животных, а также уровни в них белка SIERP61.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и воздействие на них. Самцы преждевременно стареющих крыс OXYS в возрасте 9 мес. (~350 г) и одновозрастные крысы Вистар (контроль) были получены в ЦКП Генофонды лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия, [RFMEFI61914X0005 и RFMEFI61914X0010]; линия крыс OXYS была получена из линии крыс Вистар в Институте цитологии и генетики СО РАН, как было описано ранее [19, 25]. Крысы содержались в стандартных условиях вивария (4–5 самцов в одной пластиковой клетке, наполнитель — опилки) в фиксированном режиме освещенности (цикл 12 ч свет/12 ч темнота, свет включался в 8 ч утра). Животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму (ПК-120-1; ООО “Лабораторснаб”, Москва, Россия) и воде. Ни одно животное не умерло в течение эксперимента. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

Для оценки влияния перорального введения ТС-2153 (в возрасте от 9 до 13 мес.) на прогрессию признаков БА у крыс OXYS мы случайным образом методом простой рандомизации распределили 9-месячных самцов крыс OXYS в одну из двух групп (по 22 животных в группе). Набор экспериментальной группы осуществлялся не экспериментатором, а сотрудниками ЦКП Генофонды лабораторных животных. Размер групп (по 22 животных в экспериментальной (OXYS + ТС-2153), интактной (OXYS) и контрольной (Вистар) группах) является оптимальным для проведения адекватных поведенческих исследований.

Ранее было показано, что ТС-2153 эффективен как для перорального, так и для внутрибрюшинного введения [5, 17, 18]. ТС-2153 разводили в 2%

Tween 20 до получения концентрации 200 мг/мл непосредственно перед его введением. Далее соответствующее количество полученного раствора давали с сухариком для достижения дозировки 10 мг на кг массы тела. После этого каждая крыса получала по одному сухарику (1 см³) с добавлением ТС-2153 индивидуально. Крысы контрольной группы получали стандартный рацион + один сухарик без ТС-2153.

Исследование поведения животных. Влияние приема препарата ТС-2153 на поведение животных оценивали с помощью тестов в следующем порядке: уровень тревожности в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”, двигательная и исследовательская активность в тесте “Открытое поле”, обучение и память в тесте “Водный лабиринт Морриса”; каждое животное наблюдалось в каждом тесте только один раз. Каждый параметр в тестах оценивался наблюдателем вручную. Все тесты проводились в период времени с 10 до 14 ч во избежание флуктуаций поведения, вносимых суточными ритмами.

Тест “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Уровень тревожности интактных крыс OXYS и Вистар, а также крыс OXYS, получавших ТС-2153, оценивали в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” (n = 22 в группе). Установка сделана из непрозрачного оргстекла и представляет собой 4 рукава — два противоположных “открытых рукава” без стенок (50 × 10 см) и два “закрытых рукава” того же размера, но со стенками высотой 40 см. Каждый рукав был разлинован на пять равных квадратов (10 × 10 см). Четыре рукава соединялись центральным квадратом (100 см²). Установка была приподнята на 50 см над уровнем пола. Животное помещали в центральный квадрат крестообразного лабиринта и в течение 5 мин регистрировали его поведение. Оценивали количество входов в рукава лабиринта, пройденную дистанцию и время, проведенное в них. Меньшее количество времени, проведенного в открытых рукавах, указывало на повышенный уровень тревожности.

Тест “Открытое поле”. Тест “Открытое поле” проводили через 48 часов после завершения теста “Приподнятый крестообразный лабиринт” для оценки двигательной и исследовательской активности intactных крыс OXYS и Вистар, а также крыс OXYS, получавших ТС-2153 ($n = 22$ в группе). Установка представляла собой закрытую квадратную арену из непрозрачного оргстекла (100×100 см), окруженную стенками высотой 40 см. Арена была расчерчена линиями на 100 равных квадратов. Центральная область была определена как квадрат 40×40 см. Центральный источник света на потолке мощностью 100 Вт обеспечивал постоянное освещение в темной комнате. Каждую крысу помещали в один и тот же угол арены, обращенный в одну и ту же сторону, и позволяли свободно исследовать арену в течение 5 минут. Двигательную и исследовательскую активность оценивали путем подсчета пройденной дистанции и количества совершенных животными вертикальных стоек. Кроме того, уровень тревожности оценивали, фиксируя время до первого выхода в центральную область; животное находилось в центральной области, если все четыре лапы находились в ней.

Тест “Водный лабиринт Морриса”. Тест “Водный лабиринт Морриса” [26] был использован для оценки гиппокамп-зависимой пространственной памяти крыс ($n = 8$ в группе). Животным было необходимо найти платформу в бассейне с водой, используя внешние визуальные стимулы. Поведенческое тестирование проводилось в возрасте с 12.5 до 13 мес., как было описано ранее [23]. Животных тестировали в круглом бассейне, платформа была погружена на 2 см ниже поверхности воды, в воде было растворено сухое молоко для того, чтобы скрыть платформу. Температура воды составляла $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Были обозначены две главные оси лабиринта, разделяющие арену на четыре равных сектора. Платформа располагалась в середине первого сектора в течение всего 5-дневного периода обучения. Тестирование проводилось в течение пяти последовательных дней с четырьмя попытками в день, по одной попытке каждый день с каждой из четырех возможных стартовых позиций. Каждая попытка длилась либо 70 с, либо заканчивалась, когда животное находило скрытую платформу. Долговременная память количественно оценивалась на 6 день тестирования, когда платформа была убрана из бассейна. Животным предоставлялось 70 с для исследования бассейна. Фиксировалось время, проведенное животным в секторе, где ранее располагалась платформа. Каждая попытка записывалась на камеру и обрабатывалась наблюдателем вручную.

Забор и хранение образцов. После окончания поведенческих тестов животных анестезировали CO_2 и декапитировали. Для иммуноферментного анализа (ИФА) и вестерн-блот анализа гиппо-

камп и префронтальную кору быстро выделяли, помещали в микроцентрифужные пробирки для выделения белка и замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при температуре -70°C до проведения анализа.

Замороженные образцы гиппокампа и префронтальной коры intactных крыс OXYS и Вистар, а также крыс OXYS, получавших ТС-2153, ($n = 6-8$ в группе) гомогенизировали в лизирующем буфере с RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) с добавлением смеси ингибиторов протеаз (№ P8340, Sigma-Aldrich, США). После инкубации в течение 20 мин на льду образцы центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при 40°C , супернатанты переносили в новые пробирки. Концентрацию общего белка определяли количественно с помощью набора Bio-Rad Bradford Kit (Bio-Rad Laboratories, США).

Иммуноферментный анализ. Содержание амилоида- β 1-42 (A β 1-42) оценивали ИФА в соответствии с инструкциями производителя (Human/Rat ELISA Kit; Япония). Количественное определение проводили на основе измерения оптической плотности на спектрофотометре, концентрацию белка A β 1-42 рассчитывали в пикограммах на миллиграмм общего белка гиппокампа или коры головного мозга.

Вестерн-блот анализ. Белки (по 30 мкг на дорожку) разделяли с помощью электрофореза на 10%-ном ПААГ SDS в Tris-глициновом буфере с pH 8.3 при комнатной температуре, затем переносили на нитроцеллюлозные мембраны. После блокирования в течение 2 ч раствором 5% БСА (№ SLBJ8588V; Sigma-Aldrich, США) в PBS, содержащем 0.1% Tween 20, каждую мембрану инкубировали ночь с поликлональными мышинными антителами к STEP (разведение 1 : 1000; № sc-2031; Santa Cruz Biotechnology, США) при температуре 4°C . Далее проводили инкубирование с соответствующими вторичными антителами (разведение 1 : 5000; № ab6808; Abcam, США) в течение 2 ч при комнатной температуре, мембрану обрабатывали SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., США) в соответствии с инструкциями производителя. Интенсивность свечения бендов измерялась количественно в программе ImageJ (NIH, США). Для оценки содержания референсного белка использовали антитела к β -актину (разведение 1 : 5000; № ab1801; Abcam, США).

Статистический анализ. Результаты оценивались с помощью однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа (программное обеспечение Statistica 8.0; StatSoft, США). Нормальность распределения проверяли по критерию Шапиро-Уилка. Тест Ньюмана-Кейлса post hoc был применен к основным значимым эффектам и взаимодействиям для оценки межгрупповых различий

между интактными крысами OXYS и Wistar, а также между интактными и опытными крысами OXYS. Для зависимых парных сравнений был применен *t*-критерий для зависимых выборок. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (mean $\pm$ SEM). Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка поведения животных в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Мы не выявили значимых различий в уровне тревожности крыс OXYS и Вистар в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” (рис. 2а–г): действительно, количество выходов в открытые рукава лабиринта, проведенное в них время и пройденное расстояние достоверно не различались между линиями ($p > 0.05$). В то же время, препарат ТС-2153 уменьшил время нахождения крыс OXYS в открытых рукавах лабиринта ($p < 0.02$; тест Ньюмана–Кейлса), что свидетельствует об увеличении уровня тревожности. Однако этот параметр значимо не различался между крысами OXYS, получавшими ТС-2153, и контрольными крысами Вистар.

У крыс OXYS была значительно снижена двигательная активность: расстояние, пройденное в закрытых рукавах лабиринта, и количество вертикальных стоек было ниже, чем у крыс Вистар ($p < 0.008$ и $p < 0.006$ соответственно; тест Ньюмана–Кейлса). Прием препарата ТС-2153 не повлиял на эти параметры у крыс OXYS. Исследовательская активность (выглядывания из закрытых рукавов, свешивания с открытых рукавов) не различалась между крысами OXYS и Вистар, и препарат ТС-2153 не влиял на эти параметры.

Таким образом, мы не обнаружили достоверных различий в уровне тревожности между крысами OXYS и Вистар (рис. 1д–е), однако прием ТС-2153 повышал уровень тревожности у крыс OXYS.

Поведение животных в тесте “Открытое поле”. Результаты теста “Открытое поле” представлены на рис. 3. Как и ожидалось, дисперсионный анализ показал, что крысы OXYS были значительно более пассивными, чем крысы Вистар того же возраста: количество пересеченных квадратов и количество вертикальных стоек были значительно ниже у крыс OXYS ($F_{1,45} = 13.4$, $p < 0.001$ и $F_{1,45} = 10.0$, $p < 0.003$ соответственно).

Время первого выхода в центральную область открытого поля ассоциировано с уровнем тревожности животных. Согласно результатам ANOVA-анализа, время выхода в центральную область было больше у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар ($F_{1,45} = 5.7$, $p < 0.02$), что может отражать повышенную тревожность крыс OXYS. Более

низкая частота груминга может быть связана со сниженным уровнем тревожности и/или снижением активности. ANOVA-анализ показал, что частота груминга у крыс OXYS была немного ниже ($F_{1,45} = 3.9$, $p = 0.05$) по сравнению с крысами Вистар.

Прием ТС-2153 значительно снизил двигательную и исследовательскую активность крыс OXYS в тесте “Открытое поле”: уменьшил количество пересеченных квадратов и вертикальных стоек ($F_{1,36} = 4.1$, $p < 0.05$ и $F_{1,37} = 5.1$, $p < 0.03$ соответственно) — и не влиял на задержку выхода в центральную область открытого поля и на частоту груминга.

Исследование способности к обучению и памяти крыс в тесте “Водный лабиринт Морриса”. Результаты ANOVA-анализа показали лишь незначительное влияние генотипа ($F_{1,109} = 3.5$, $p = 0.064$) на латентный период нахождения платформы, а post hoc анализ не выявил достоверных различий в способности к обучению между крысами OXYS и Вистар (рис. 4а): животные обеих линий научились находить скрытую под водой платформу в 1 (целевом) секторе уже на 2-й день обучения ($p < 0.05$; *t*-тест для зависимых выборок). Крысы OXYS, получавшие ТС-2153, также научились находить скрытую платформу на 2-й день обучения ($p < 0.006$; *t*-тест для зависимых выборок). Закономерно, что латентный период нахождения платформы постепенно снижался к 5-му дню обучения у крыс обеих линий ($F_{4,109} = 26.0$, $p < 0.0001$).

Долговременную память оценивали на 6-й день, когда платформа была удалена, с помощью *t*-критерия для зависимых выборок. ANOVA-анализ не выявил межлинейных различий во времени, проведенном животными в целевом секторе на 6-й день тестирования ($F_{1,22} = 0.1$, $p = 0.74$); однако крысы Вистар в пределах своей линии демонстрировали предпочтение целевого сектора остальным секторам ($p < 0.04$), что свидетельствует о запоминании животными месторасположения платформы (рис. 4б). Крысы OXYS, напротив, проводили примерно равное количество времени во всех четырех секторах ($p = 0.58$). Введение ТС-2153 оказало благоприятное влияние на долговременную память животных: крысы OXYS, получавшие препарат, проводили значительно больше времени в целевом секторе по сравнению с другими секторами ($p < 0.02$).

Важно отметить, что время нахождения платформы достоверно не отличались между крысами OXYS и Вистар во все дни обучения и прием ТС-2153 на это не оказывал влияния.

Влияние ТС-2153 на уровень Аβ1-42 в гиппокампе и фронтальной коре. В этом исследовании мы провели оценку влияния приема ТС-2153 с 9-месячного возраста на содержание Аβ1-42 в гиппокампе и фронтальной коре крыс OXYS. Результа-

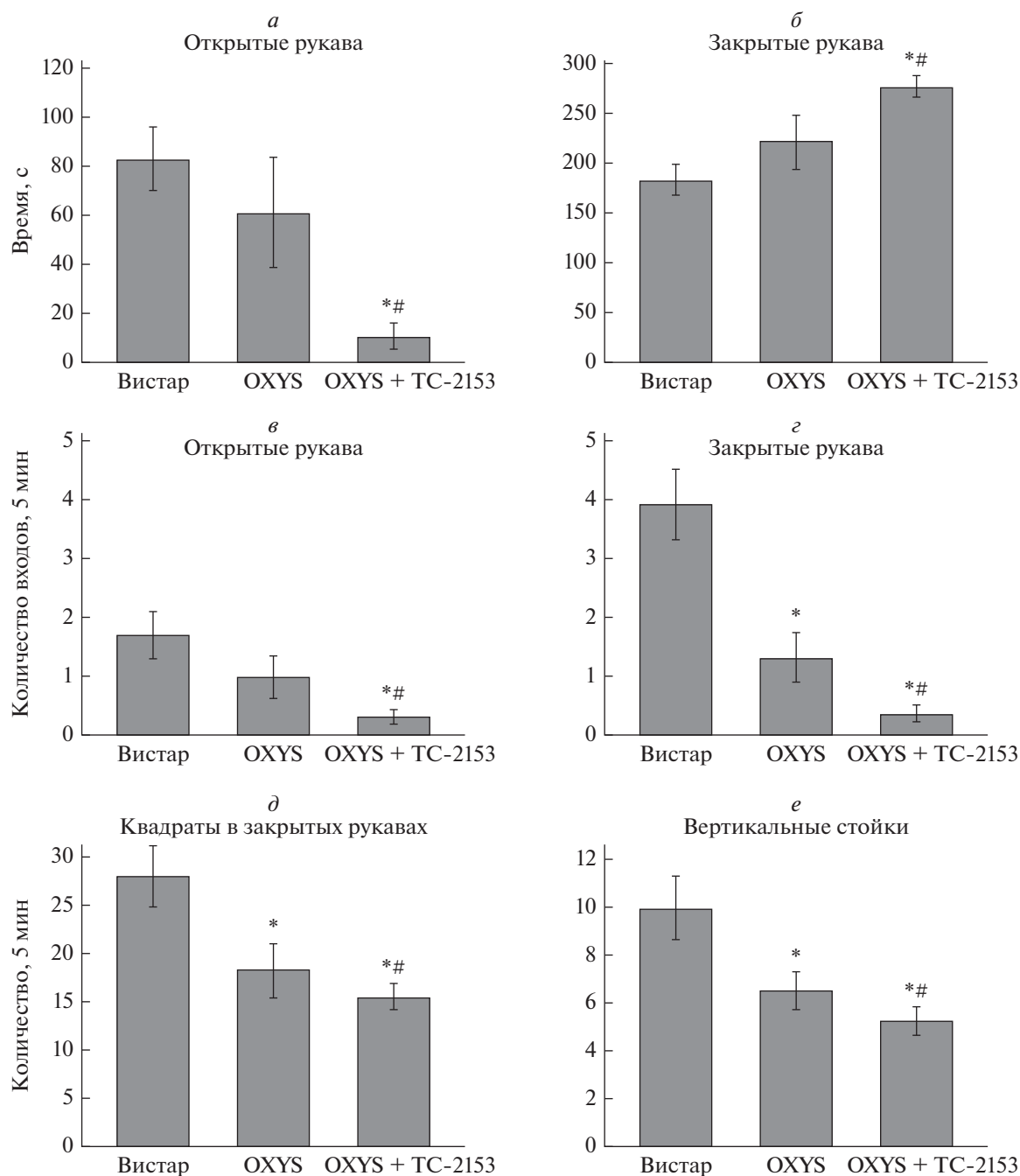


Рис. 2. Влияние приема препарата ТС-2153 на уровень тревожности крыс OXYs в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Крысы OXYs совершали меньше входов в закрытые рукава (г) по сравнению с крысами Вистар. Пероральное введение ТС-2153 уменьшало время, проведенное крысами OXYs в открытых (а) и закрытых (б) рукавах, а также количество выходов в открытые (в) и закрытые (г) рукава. Крысы OXYs продемонстрировали значительно более низкое количество вертикальных стоек (е) по сравнению с крысами Вистар. ТС-2153 значительно уменьшал количество пересеченных квадратов (д) и количество вертикальных стоек (е) у крыс OXYs. Данные представлены как $mean \pm SEM$; * $p < 0.05$ для межгрупповых различий; # $p < 0.05$ для эффектов приема ТС-2153. $n = 22$ животных в группе.

ты ANOVA-анализа показали, что содержание $\beta 1-42$ в гиппокампе и фронтальной коре у крыс OXYs было значительно выше, чем у крыс Вистар ($F_{1,18} = 146, p < 0.0001$ и $F_{1,18} = 86, p < 0.0001$ соответственно), и прием ТС-2153 на содержание

$\beta 1-42$ не влиял ($F_{1,18} = 0.38, p = 0.54$ для гиппокампа и $F_{1,18} = 0.88, p = 0.36$ для фронтальной коры): уровень $\beta 1-42$ в коре головного мозга и гиппокампе крыс OXYs оставался почти вдвое выше, чем у крыс Вистар (рис. 5а).

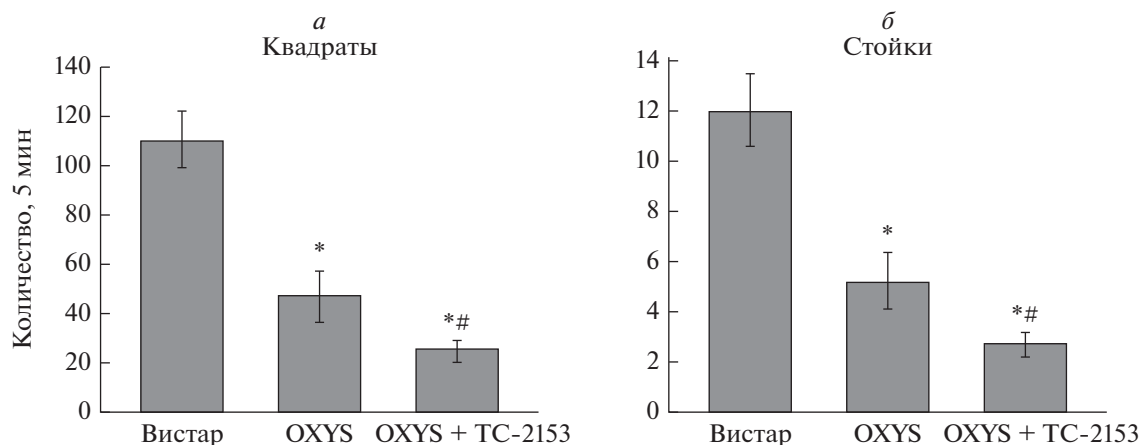


Рис. 3. Влияние приема препарата TC-2153 на поведение крыс OXYS в тесте “Открытое поле”. Крысы OXYS демонстрировали значительно меньшее количество пересеченных квадратов (а) и вертикальных стоек (б) по сравнению с крысами Вистар. TC-2153 значительно уменьшал количество пересеченных квадратов (а) и вертикальных стоек (б) у крыс OXYS. Данные представлены как $mean \pm SEM$; * $p < 0.05$ для межгрупповых различий; # $p < 0.05$ для эффектов TC-2153. $n = 22$ животных в группе.

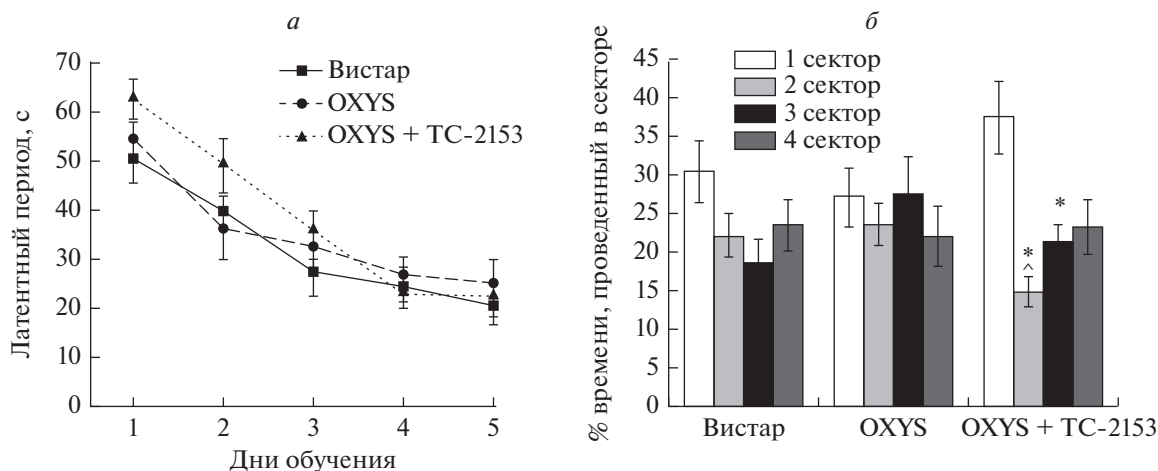


Рис. 4. Влияние приема препарата TC-2153 на пространственную память крыс OXYS в тесте “Водный лабиринт Морриса”. Латентный период нахождения скрытой под водой платформы (а) снижался с 1-го по 5-й день обучения. TC-2153 увеличил время, проведенное крысами OXYS в 1 (целевом) секторе по сравнению с другими секторами (б) на 6-й день обучения, когда платформа была удалена. Время нахождения платформы (а) не различалось между группами животных. Данные представлены как $mean \pm SEM$. Условные обозначения: различия $^{\wedge}p < 0.05$ — для различий с предыдущим днем обучения; @ $p < 0.05$ — для различий между временем, проведенным в целевом секторе, и другими секторами. Черная линия — средний процент времени в каждом из четырех секторов. $n = 8$ животных в группе.

Влияние TC-2153 на уровень белка STEP61 в коре головного мозга и гиппокампе крыс OXYS. Далее мы исследовали уровни изоформы STEP61 в коре головного мозга и гиппокампе методом вестерн-блот анализа (рис. 5б). ANOVA-анализ не выявил влияние фактора “генотип” на содержание изоформы STEP61 в коре ($F_{1,8} = 0.12$, $p = 0.73$) и гиппокампе животных ($F_{1,10} = 0.31$, $p = 0.59$). Прием TC-2153 не оказывал влияния на уровень белка STEP61 ни в одной из структур мозга крыс OXYS ($F_{1,8} = 0.39$, $p = 0.55$ для коры и $F_{1,10} = 0.057$, $p = 0.55$ для гиппокампа).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменения в поведении у крыс OXYS начинаются в возрасте ~3 мес. и рассматриваются нами как наиболее раннее проявление ускоренного старения их мозга. С возрастом изменения нарастают на фоне постепенного накопления A β , и, как подтвердило настоящее исследование, в возрасте 13 мес. поведение крыс OXYS существенно отличается от такового у контрольных крыс Вистар. Длительный прием ингибитора STEP TC-2153 увеличил эти различия — вдвое снизил двигательную и исследовательскую активность крыс OXYS в тесте

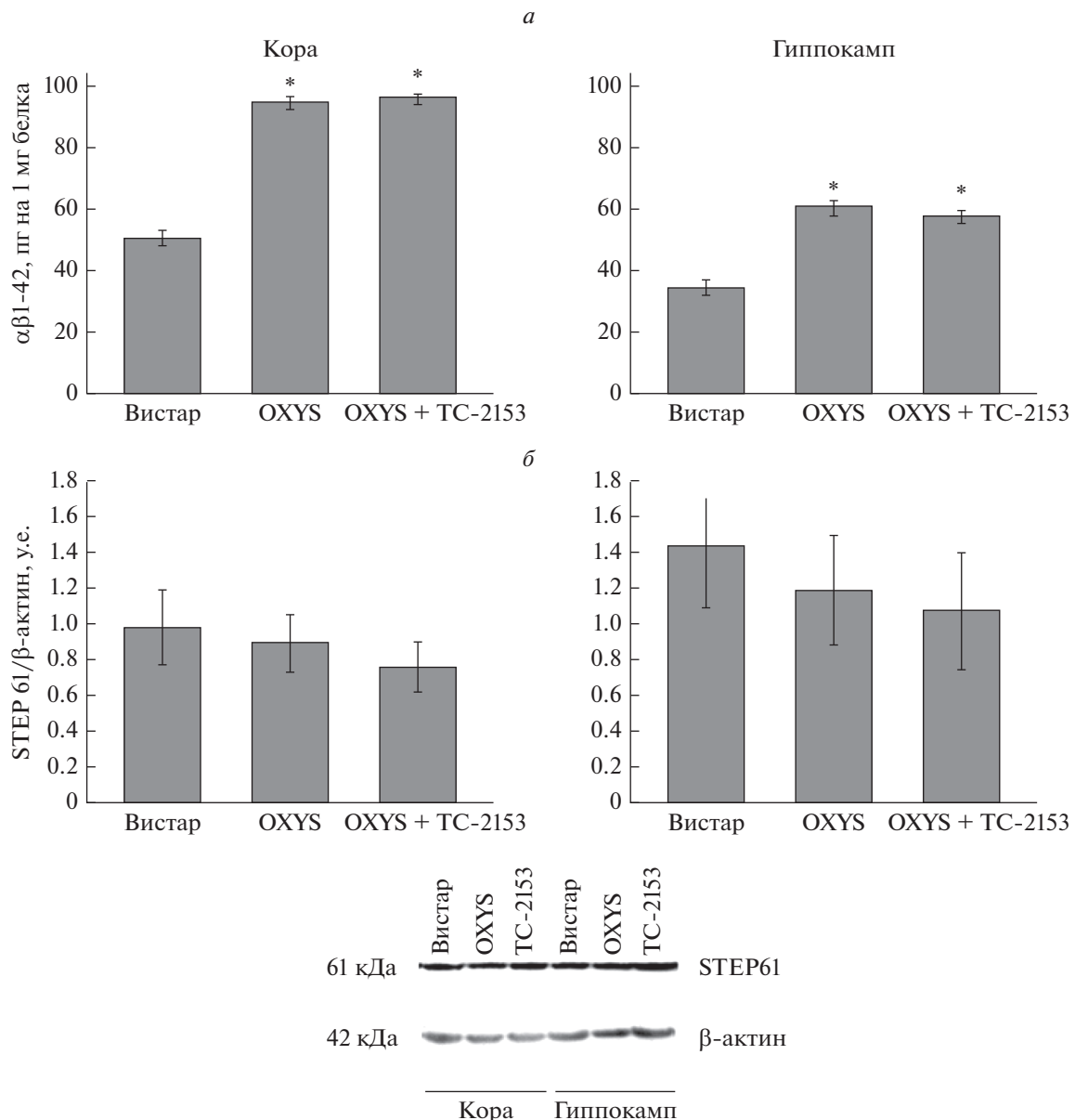


Рис. 5. Уровни белков $A\beta 1-42$ и изоформы STEP61 в коре головного мозга и гиппокампе интактных крыс OXYS и Вистар и крыс OXYS, получавших ТС-2153. Уровни $A\beta 1-42$ (а) были выше в коре головного мозга и гиппокампе крыс OXYS. Уровни STEP61 (б) не различались между крысами OXYS и Вистар в коре головного мозга и гиппокампе. Прием ТС-2153 не оказал влияния на содержание обоих исследуемых белков. Данные представлены как $mean \pm SEM$; * $p < 0.05$ для межгрупповых различий. $n = 6$ животных в группе.

“открытое поле” и значительно повысил их тревожность в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”. Таким образом, ТС-2153 отрицательно повлиял на поведенческие проявления БА-подобной патологии у крыс OXYS. В то же время мы не выявили отрицательного влияния ТС-2153 на обучение крыс OXYS в водном лабиринте Морриса, и при этом он положительно повлиял на долговременную память животных: крысы OXYS, получавшие препарат, проводили значительно больше времени в целевом секторе 1. Следует от-

метить, что пространственное обучение крыс OXYS в возрасте 13 мес. существенно не отличается от такового у крыс Вистар. Значительное снижение когнитивных функций в тесте “Водный лабиринт Морриса” регистрируется у крыс OXYS, начиная с возраста 14–16 мес. [27, 28]. В то же время в 8-рукавном радиальном лабиринте дефицит обучения и долговременной памяти проявляется у крыс OXYS уже в возрасте 3 мес. [29].

Как сообщалось ранее, кратковременное ингибирование STEP с помощью TS-2153 способно

положительно влиять на память, зависящую от гиппокампа: снижало дефицит памяти у старых крыс Sprague-Dawley (в возрасте 20–22 мес.) при ее тестировании в Т-образном лабиринте [12], а также устраняло когнитивные нарушения у 12-месячных мышей 3xTg-AD [5]. Выполнение задач в водном лабиринте Морриса связано с долгосрочной потеннциацией и функцией рецептора NMDA, и этот тест является ключевым методом исследования функций гиппокампа [30, 31]. В настоящем исследовании мы не выявили различий в способности к обучению крыс OXYS и Вистар в водном лабиринте Морриса и ТС-2153 не повлиял на нее. Тем не менее, долговременная память у крыс OXYS была снижена, а прием ТС-2153 позитивно повлиял на нее. Следовательно, в этом отношении наши данные совпадают с результатами исследования эффектов краткосрочного введения ТС-2153 на когнитивные функции [5]. Важно, что при этом эффекты кратковременного подавления STEP у 6-месячных мышей 3xTg-AD не были связаны с изменением уровней A β или фосфотау [5]. Длительное введение ТС-2153 в нашем исследовании также не повлияло на уровень A β в гиппокампе и префронтальной коре головного мозга крыс OXYS. Следует отметить, что в последней публикации группы Lombroso [32] сообщается, что способность ТС-2153 улучшать когнитивные функции у мышей 3xTg-AD может быть связана с усилением синаптогенеза. Однако в процессе синаптогенеза могут образовываться не только функциональные, но и молчащие синапсы [33, 34]. Ранее мы выявили усиление синаптогенеза у 5-месячных крыс OXYS, но при этом большинство новообразованных синапсов были неактивны [20]. Не исключено, что снижение локомоторной активности и повышение тревожности у крыс OXYS на фоне приема ТС-2153 связано с образованием в гиппокампе абберантных синапсов.

Мы не выявили различий в уровне белка STEP61: он был одинаковым как в коре мозга, так и в гиппокампе крыс OXYS и Вистар, и на него не повлиял длительный прием ТС-2153. По данным Jian Xu и соавторов [5], ТС-2153 может подавлять активность STEP, образуя ковалентную связь с Cys472 активного сайта, которая необходима для ферментативной активности, не изменяя при этом общее количество STEP и ее фосфорилированной формы. Мы не исследовали активность и фосфорилирование STEP61 в коре мозга и гиппокампе, но изучили их в сетчатке крыс OXYS при оценке эффектов длительного приема ТС-2153 по той же схеме [35]. Признаки БА у крыс OXYS развивается одновременно с другими проявлениями преждевременного старения, одним из которых является ретинопатия, аналогичная возрастной макулярной дегенерации (ВМД) у людей [21]. Это заболевание имеет ряд общих клинических и гистопатологических особенностей с БА, и некото-

рые исследователи рассматривают ВМД как БА глаз [36]. Мы показали [35], что повышение уровня белка STEP61 и снижение, по сравнению с контрольными крысами Вистар, активности общей и STEP фосфатаз в сетчатке предшествуют проявлению клинических признаков ВМД у крыс OXYS. В то же время мы не выявили каких-либо различий в этих параметрах сетчатки у 13-месячных крыс Вистар и крыс OXYS с выраженными признаками ВМД. Более того, ингибирование STEP с помощью ТС-2153 с возраста 9 до 13 мес., как и в настоящем исследовании, негативно повлияло на нейроретину, но при этом не изменило уровни мРНК гена *Ptpn5*, белков STEP46 и STEP61, а также их фосфатазную активность в сетчатке крыс OXYS [35]. Эти результаты, как и данные, полученные в настоящем исследовании, предполагают, что эффекты длительного приема ТС-2153 могут быть опосредованы механизмами, не связанными со STEP. Ранее было показано [9], что его эффекты могут быть опосредованы влиянием как на серотонинергическую систему мозга, так и на BDNF, изменения которого при старении способствуют развитию нейродегенеративных процессов. Ранее нами было выявлено двукратное, по сравнению с крысами Вистар, снижение уровня BDNF в гиппокампе крыс OXYS в возрасте 12 мес. [29].

Известно, что STEPс являются редокс-зависимыми ферментами: с одной стороны, окислительный стресс, вызванный перекисью водорода, приводит к значительному увеличению образования димеров и олигомеров более высокого порядка STEP61, тем самым вызывая значительное снижение его ферментативной активности [37], с другой – ингибирование STEP посредством ТС-2153 может быть отменено инкубацией с тиолами, такими как глутатион или дитиотреитол [5]. В то же время появились данные о том, что сам ТС-2153 способен модулировать редокс-статус клеток. В недавнем обзоре [38] ТС-2153, как и другие катенированные двухвалентные органические соединения серы, рассматривается как перспективное пролекарство – потенциальный донор H₂S. H₂S – эндогенный газотрансмиттер, способный модулировать окислительно-восстановительный гомеостаз клетки, действуя как антиоксидант и проявляя широкий спектр цитопротекторных и физиологических функций при возрастных заболеваниях [39]. Примечательно, что у пациентов с БА наблюдается значительное снижение уровня H₂S, что позволяет рассматривать использование доноров H₂S как многообещающую стратегию лечения нейродегенеративных заболеваний [40]. Действительно, положительные эффекты кратковременного воздействия ТС-2153 уже получены на моделях семейной формы БА, депрессивных расстройств [9] и аутизма [41]. Однако следует отметить, что не только окислительный,

но и восстановительный стресс, в том числе — на фоне избытка H_2S , может развиваться в клетке и приводить к побочным эффектам [42].

Таким образом, результаты нашего исследования длительного приема ТС-2153 в отношении развития как БА-, так и ВМД-подобной патологии у крыс ОХYS противоречивы: улучшив долговременную память, ТС-2153 значительно уменьшил и без того сниженную двигательную и исследовательскую активность и увеличил тревожность животных — изменения, которые мы рассматриваем как проявления ускоренного старения их мозга. Еще более тревожным представляется негативное влияние ТС-2153 на нейроны сетчатки, о котором мы сообщали ранее [35]. Можно предположить, что длительный прием ТС-2153 повлиял на окислительно-восстановительный баланс. При этом избыточный восстановительный потенциал мог, вызывая изменения в образовании дисульфидных связей в белках, повлиять на клеточные сигнальные пути, изменить транскрипционную активность, подавить функцию митохондрий и снизить клеточный метаболизм [43]. Неслучайно избыточное потребление пищевых добавок с антиоксидантами, таких как витамины и/или флавоноиды, способно приводить к проокислительным эффектам, которые могут изменять окислительно-восстановительное равновесие клеток и способствовать снижению стресса, но при этом даже сокращать продолжительность жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на неоднозначность эффектов длительного приема ТС-2153, мы согласны с Gü Gönj and G.A. Morales [38] в том, что ТС-2153, а также его аналоги в перспективе могут стать эффективными фармакологическими терапевтическими агентами. Тем не менее, необходимы дополнительные исследования на различных моделях животных для изучения механизмов действия ТС-2153, поиска оптимальных доз и продолжительности терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 14.W03.31.0034 (мега-грант).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frere S., Slutsky I. // *Neuron*. 2018. V. 97. № 1. P. 32–58.
2. *Alzheimer's Disease International*. // *Alzheimer's Disease International*: London, UK, 2019. P. 13–16.
3. Querfurth H.W., LaFerla F.M. // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 362. P. 329–344.
4. Crous-Bou M., Minguillón C., Gramunt N., Molinuevo J.L. // *Alzheimers Res. Ther.* 2017. V. 9. 71.
5. Xu J., Chatterjee M., Baguley T.D., Brouillette J., Kurup P., Ghosh D., Kanyo J., Zhang Y., Seyb K., Ononenyi C., Foscoe E., Anderson G.M., Gresack J., Cuny G.D., Glicksman M.A., Greengard P., Lam T.T., Tautz L., Nairn A.C., Ellman J.A., Lombroso P.J. // *PLoS Biol.* 2014. V. 12. № 8. e1001923.
6. Kamceva M., Benedict J., Nairn A.C., Lombroso P.J. // *Neural. Plast.* 2016. V. 2016. 8136925.
7. Bult A., Zhao F., Dirks Jr. R., Sharma E., Lukacs E., Solimena M., Naegle J.R., Lombroso P.J. // *J. Neurosci.* 1996. V. 16. № 24. P. 7821–7831.
8. Boulanger L.M., Lombroso P.J., Raghunathan A., Doring M.J., Wahle P., Naegle J.R. // *J. Neurosci.* 1995. V. 15. № 2. P. 1532–1544.
9. Kulikova E.A., Kulikov A.V. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2017. V. 18. № 11. P. 1152–1162.
10. Saavedra A., Ballesteros J.J., Tyebji S., Martínez-Torres S., Blázquez G., López-Hidalgo, R. Azkona G., Alberch J., Martín E.D., Pérez-Navarro E. // *Mol. Neurobiol.* 2019. V. 56. № 2. P. 1475–1487.
11. Chen X., Lin R., Chang L., Xu S., Wei X., Zhang J., Wang C., Anwyl R., Wang Q. // *Neuroscience*. 2013. V. 253. P. 435–443.
12. Castonguay D., Dufort-Gervais J., Ménard C., Chatterjee M., Quirion R., Bontempi B., Schneider J.S., Arnsten A.F.T., Nairn A.C., Norris C.M., Ferland G., Bézard E., Gaudreau P., Lombroso P.J., Brouillette J. // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. № 7. P. 1079–1089.e4.
13. Carty N.C., Xu J., Kurup P., Brouillette J., Goebel-Goody S.M., Austin D.R., Yuan P., Chen G., Correa P.R., Haroutunian V., Pittenger C., Lombroso P.J. // *Transl. Psychiatry*. 2012. V. 2. № 7. e137.
14. Goebel-Goody S.M., Wilson-Wallis E.D., Royston S., Tagliatela S.M., Naegle J.R., Lombroso P.J. // *Genes Brain Behav.* 2012. V. 11. № 5. P. 586–600.
15. Kurup P.K., Xu J., Videira R.A., Ononenyi C., Baltazar G., Lombroso P.J., Nairn A.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 4. P. 1202–1207.
16. Zhang Y., Kurup P., Xu J., Carty N., Fernandez S.M., Nygaard H.B., Pittenger C., Greengard P., Strittmatter S.M., Nairn A.C., Lombroso P.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 44. P. 19014–19019.
17. Khomenko T.M., Tolstikova T.G., Bolkunov A.V., Dolgikh M.P., Pavlova A.V., Korchagina D.V., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F. // *Lett. Drug. Des. Discov.* 2009. V. 6. P. 464–467.
18. Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikova E.A., Volcho K.P., Khomenko T.M., Salakhutdinov N.F., Popova N.K. //

- Psychopharmacology (Berl). 2012. V. 221. № 3. P. 469–478.
19. *Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., Korbolina E.E., Muraleva N.A., Kolosova N.G.* // Cell Cycle. 2014. V. 13. № 6. P. 898–909.
 20. *Stefanova N.A., Muraleva N.A., Korbolina E.E., Kiseleva E., Maksimova K.Y., Kolosova N.G.* // Oncotarget. 2015. V. 6. № 3. P. 1396–1413.
 21. *Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Bayborodin S.I., Kolosova N.G.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. 41533.
 22. *Telegina D.V., Suvorov G.K., Kozhevnikova O.S., Kolosova N.G.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 22. 5632.
 23. *Stefanova N.A., Muraleva N.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G.* // J. Alzheimers Dis. 2014. V. 38. № 3. P. 681–694.
 24. *Muraleva N.A., Stefanova N.A., Kolosova N.G.* // Antioxidants (Basel). 2020. V. 9. № 8. 676.
 25. *Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И.* // Генетика. 1975. Т. 11. С. 63–71.
 26. *Morris R.* // J. Neurosci. Methods. 1984. V. 11. № 1. P. 47–60.
 27. *Stefanova N.A., Fursova A.Z., Kolosova N.G.* // J. Alzheimers Dis. 2010. V. 21. № 2. P. 479–491.
 28. *Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Peregud D.I., Lazareva N.A., Moiseeva Y.V., Nesterenko A.N., Novikova M.R., Stefanova N.A., Kolosova N.G., Gulyaeva N.V.* // Neurochem. J. 2018. V. 12. P. 184–194.
 29. *Rudnitskaya E.A., Maksimova K.Yi., Muraleva N.A., Logvinov S.V., Yanshole L.V., Kolosova N.G., Stefanova N.A.* // Biogerontology. 2015. V. 16. № 3. P. 303–316.
 30. *Vorhees C.V., Williams M.T.* // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 848–858.
 31. *Nunez J.* // J. Vis. Exp. 2008. V. 19. 897.
 32. *Chatterjee M., Kwon J., Benedict J., Kamceva M., Kurup P., Lombroso P.J.* // Exp. Brain Res. 2021.
 33. *Kullmann D.M.* // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2003. V. 358. № 1432. P. 727–733.
 34. *Koya E., Dong Y.* // Neuropsychopharmacology. 2018. V. 43. № 10. P. 1981–1982.
 35. *Telegina D.V., Kulikova E.A., Kozhevnikova O.S., Kulikov A.V., Khomenko T.M., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Kolosova N.G.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 15. 5182.
 36. *Papadopoulos Z.* // Curr. Aging Sci. 2020. V. 13. № 2. P. 102–112.
 37. *Deb I., Poddar R., Paul S.* // J. Neurochem. 2011. V. 116. № 6. P. 1097–1111.
 38. *Gojon G., Morales G.A.* // Antioxid. Redox Signal. 2020. V. 33. № 14. P. 1010–1045.
 39. *Tabassum R., Jeong N.Y., Jung J.* // Neural Regen. Res. 2020. V. 15. № 4. P. 653–662.
 40. *Sestito S., Pruccoli L., Runfola M., Citi V., Martelli A., Saccomanni G., Calderone V., Tarozzi A., Rapposelli S.* // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 184. 111745.
 41. *Chatterjee M., Singh P., Xu J., Lombroso P.J., Kurup P.K.* // Behav. Brain. Res. 2020. V. 391. 112713.
 42. *Lloret A., Fuchsberger T., Giraldo E., Vina J.* // Curr. Alzheimer Res. 2016. V. 13. № 2. P. 206–211.
 43. *Pérez-Torres I., Guarner-Lans V., Rubio-Ruiz M.E.* // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 10. 2098.

Ambiguous Effects of Prolonged Dietary Supplementation with a Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor, TC-2153, on a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease

**E. A. Rudnitskaya^a, A. O. Burnyasheva^a, T. A. Kozlova^a, N. A. Muraleva^a, D. V. Telegina^a,
T. M. Khomenko^b, K. P. Volcho^b, N. F. Salakhutdinov^b, and N. G. Kolosova^a**

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

^b*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia and is currently incurable. After unsuccessful attempts to create drugs targeting the amyloid- β pathway, a search for alternative approaches and treatments targeting nonamyloid AD pathologies is currently underway. One of them is inhibition of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) activity, which is increased in the prefrontal cortex of AD patients. Here we examined effects of prolonged treatment of OXYS rats which mimic key signs of sporadic AD with a STEP inhibitor, TC-2153, on the progression of signs of AD. TC-2153 had an ambiguous effect on the behavior of the animals: it significantly reduced the already low locomotor and exploratory activities and enhanced anxiety-related behavior in OXYS rats but improved their long-term memory in the Morris water maze. Moreover, TC-2153 had no effect on the accumulation of the amyloid- β protein and on the STEP61 protein level; the latter in the cortex and hippocampus did not differ between OXYS rats and control Wistar rats. These results suggest that the effects of prolonged treatment with TC-2153 may be mediated by mechanisms not related to STEP. In particular, TC-2153 can act as a potential hydrogen sulfide donor and thus substantially affect redox homeostasis.

Keywords: *alzheimer's disease, striatal-enriched protein tyrosine phosphatase STEP, STEP inhibitor, synthetic compound TC-2153, OXYS rats*