

СОДЕРЖАНИЕ

Том 39, номер 1, 2022

Обзоры

- Овариоэктомия как модель тревожно-депрессивных расстройств
Г. А. Григорьян 3
- Нейропротекторный потенциал креатина и его терапевтического и профилактического применения
Л. С. Нерсесова, М. С. Петросян, А. В. Арутюнян 17
- Роль пептида, активирующего аденилатциклазу гипофиза и вазоактивного интестинального пептида в патогенезе мигрени
А. Ю. Соколов, А. В. Осипчук, Я. Б. Скиба, А. В. Амелин 36
-

Теоретические работы

- Гипотетический механизм тремора покоя при болезни Паркинсона
И. Г. Силькис 45
-

Экспериментальные работы

- Морфологические изменения ГАМКергических структур головного мозга крысы в ходе постнатального развития
В. А. Разенкова, Д. Э. Коржевский 59
- Фармакологическая модуляция эндогенной нейропротекции после экспериментальной пренатальной гипоксии
И. Ф. Беленичев, Е. Г. Алиева, А. М. Камышин, Н. В. Бухтиярова, В. П. Рыженко, Н. О. Горчакова 70
- Экспрессия генов регуляции синаптической пластичности в гиппокампе и пространственное обучение у крыс разного возраста в условиях моделирования стрептозотоцинового диабета
Г. В. Карантыш, А. М. Менджерицкий, В. Н. Прокофьев, О. В. Лянгасова, М. П. Фоменко 80
- Нейрохимические изменения в островковой коре и передней поясной коре у интактных самцов и самок первого поколения крыс, подвергнутых хроническому воздействию этанола
В. Г. Коньков, В. С. Кудрин, В. Б. Наркевич, А. О. Ефимова, Т. Д. Никифорова, Л. Г. Колик 89
-

Contents

Vol. 39, no. 1, 2022

Review Articles

- Ovariectomy as a Model of Anxiety-Depressive Disorders
G. A. Grigoryan 3
- The Neuroprotective Potential of Creatine. The Hidden Resources
of Its Therapeutic and Prophylactic Use
L. S. Nersesova, M. S. Petrosyan, and A. V. Arutjunyan 17
- The Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
and Vasoactive Intestinal Peptide in Migraine Pathogenesis
A. Yu. Sokolov, A. V. Osipchuk, I. B. Skiba, and A. V. Amelin 36
-

Theoretical Articles

- Hypothetical Mechanism of Resting Tremor in Parkinson's Disease
I. G. Silkis 45
-

Experimental Articles

- Morphological Changes That Occur in GABAergic Structures of Rat's Forebrain
during Postnatal Development
V. A. Razenkova and D. E. Korzhevskii 59
- Pharmacological Modulation of Endogenous Neuroprotection
after Experimental Prenatal Hypoxia
*I. F. Belenichev, E. G. Aliyeva, O. M. Kamyshny,
N. V. Bukhtiyarova, V. P. Ryzhenko, and N. O. Gorchakova* 70
- Expression of Genes for Regulating Synaptic Plasticity in the Hippocampus
and Spatial Learning in Rats of Different Age under Conditions
of Modeling Straptosotocin Diabetes
G. V. Karantysh, A. M. Mendzheritsky, V. N. Prokofiev, O. V. Lyangasova, and M. P. Fomenko 80
- Neurochemical Changes in the Insular Cortex and Anterior Cingulate Cortex
in Intact Males and Females of the First Generation
of Rats Exposed to Chronic Ethanol Consumption
*V. G. Konkov, V. S. Kudrin, V. B. Narkevich,
A. O. Efimova, T. D. Nikiforova, and L. G. Kolik* 89
-

УДК 612.821

ОВАРИОЭКТОМИЯ КАК МОДЕЛЬ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

© 2022 г. Г. А. Григорьян*

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.08.2021 г.

После доработки 26.08.2021 г.

Принята к публикации 28.08.2021 г.

В настоящей обзорной работе приводятся данные об овариоэктомии у грызунов, как удобной модели для оценки тревожно-депрессивных расстройств у женщин в около- и менопаузном периодах жизни. В первой части обзора рассматривается влияние овариоэктомии на развитие тревожного и депрессивно-подобного поведения в зависимости от возраста животного, времени проведения операции, начала тестирования после операции, характера используемых тестов и т.д. Уделяется внимание влиянию ОЭ совместно с хроническим стрессом и заместительной функции эстрогенов у ОЭ животных. Вторая часть обзора посвящена механизмам влияния овариоэктомии и заместительной эстрогенной терапии на развитие и предупреждение тревожного и депрессивно-подобного поведения. Рассматриваются поведенческие, гормональные, биохимические, молекулярно-клеточные и внутриклеточные сигнальные механизмы действия эстрогенов у ОЭ животных. Описывается роль в этих механизмах гипоталамо-гипофизарной надпочечниковой системы, нейровоспалительной/иммунной системы, оксида азота, моноаминоэргических систем, трофических факторов, нейрогенеза, внутриклеточного сигналинга и т.д.

Ключевые слова: овариоэктомия, тревожность, депрессия, эстрогены, вынужденное плавание, приподнятый крестообразный лабиринт, предпочтение сахарозы, нейровоспаление, стресс, BDNF, нейрогенез

DOI: 10.31857/S102781332201006X

Известно, что женщины чаще, чем мужчины, страдают тревожно-депрессивными расстройствами [1]. В основе этих расстройств лежат нарушения нормальной работы гипоталамо-гипофизарной надпочечниковой системы (ГГНС) и развитие нейровоспалительного процесса со специфическими иммунными, нейрохимическими, нейротрофическими, синаптическими и другими изменениями [2–7]. Хотя женщины страдают депрессией чаще, чем мужчины, они более устойчивы к ней. Мы уже отмечали ряд факторов, которые определяют эту устойчивость [8–13]. Вместе с тем одной из главных причин, которая влияет на устойчивость женщин к развитию тревожно-депрессивных расстройств, является защитная функция стероидных половых гормонов, и прежде всего, эстрогенов. Когда с возрастом, в периоды около- и менопаузы, или при ряде гинекологических заболеваний (эндометриоз, рак яичников и др.) эта функция ослабевает, то снижается также устойчивость к развитию симптомов депрессии и тревожности. Обычно с менопаузой и

хирургической операцией удаления яичников (оофистомии) женщины встречаются в среднем возрасте. Изолированное или комбинированное с маткой удаление яичников значительно снижает уровень стероидных гормонов (эстрогена, прогестерона и тестостерона) в результате чего повышается риск развития тревожно-депрессивных расстройств. Практика показывает, что у женщин с хирургическим удалением матки и яичников депрессивные симптомы вызываются намного чаще, чем у женщин, которым операция не проводилась [14, 15]. Однако депрессивные расстройства могут быть связаны не только с недостатком выработки стероидных гормонов, но и быть следствием хронического стресса и переживаний, вызванных гинекологическим или иным заболеванием. Другими словами, надо принимать во внимание психическое состояние и настроение женщины не только после операции, но и до нее, т.е. учитывать как предоперационные, так и послеоперационные факторы. Иногда предоперационные факторы оказывают более сильное влияние на развитие депрессии, чем сама операция и ее последствия. Например, в работе [16] при анализе психоэмоционального состояния более одной тысячи женщин, перенесших операцию двухстороннего уда-

* Адресат для корреспонденции: 117865 Россия, Москва, ул. Бутлерова, д. 5а; тел.: 334-70-00; e-mail: grigorygrigoryan@hotmail.com.

ления яичников, через 12 мес. после операции депрессивные симптомы проявились в 9%, а до операции в 27% случаев. У женщин в околоменопаузную и раннюю менопаузную фазы влияние уровня стероидных гормонов на развитие депрессивного состояния более предсказуемо [17, 18]. В литературе и клинической практике на этот счет существует даже специальный термин, “околоменопаузная или менопаузная депрессия”, которую лечат с помощью эстрогенных препаратов в комбинации с классическими антидепрессантами [1, 17–19]. Зависимость проявления депрессии от уровня стероидных гормонов прослеживается также у женщин после рождения ребенка. Такую депрессию называют еще *postpartum* (послеродовая) депрессией [20]. Околоменопаузная и менопаузная депрессии и расстройства, вызванные хирургической операцией удаления яичников, проявляются в основном у женщин среднего возраста, а *postpartum* депрессия возникает в связи с гормональными сдвигами в организме, происходящими во время беременности и после рождения ребенка. Таким образом, исследования у женщины тревожно-депрессивных расстройств в зависимости от уровня стероидных половых гормонов имеют существенные ограничения. Они касаются возраста женщины, ее эмоциональной оценки собственного состояния, связи с рождением ребенка и ряда других факторов. Если к этому добавить еще необходимость соблюдения строгих этических и медицинских норм при работе с человеком, то понятно, почему исследования такого рода все больше смещаются в сторону модельных экспериментов на животных. Ниже мы подробно остановимся на роли стероидных половых гормонов в развитии тревожного и депрессивно-подобного поведения. Для этого мы детально рассмотрим эффекты удаления яичников (овариоэктомию, ОЭ) на развитие тревожно-депрессивных расстройств в зависимости от возраста животного, времени проведения операции, времени тестирования после операции, характера используемых тестов и ряда других факторов. Мы также рассмотрим механизмы развития тревожно-депрессивных расстройств под влиянием овариоэктомии и роль в этих механизмах системы стресса и нейровоспаления, преобразований во внутриклеточных сигнальных путях, участие моноаминоэргических систем, трофических и других факторов. Наконец, мы опишем защитную заместительную функцию эстрогенов при овариоэктомии, предупреждающую развитие тревожно-депрессивных расстройств посредством корректирующих влияний на отмеченные выше механизмы.

ОВАРИОЭКТОМИЯ И ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫЕ РАССТРОЙСТВА

В большинстве работ на грызунах операция овариоэктомии приводит к развитию тревожного и/или депрессивно-подобного поведения. Однако эта связь не является однозначной. Все зависит от того, в каком возрасте выполняют операцию ОЭ, через какое время после нее проводят поведенческие тесты, какие конкретно тесты проводят, на каких животных (мышьях или крысах), как оценивают действие ОЭ, применяют ее изолированно или в комбинации с хроническим стрессом разной природы и т.д.

Влияние овариоэктомии в зависимости от возраста животного. Исследования влияний ОЭ на развитие тревожного и депрессивно-подобного поведения в основном проводили на животных молодого возраста (2–3 мес.) [21–26]. Но в ряде работ влияние ОЭ исследовали на животных препубертатного [27, 28], среднего [29–31] и старого возраста [29, 32]. В некоторых работах [33, 34] проводили сравнительное исследование влияния ОЭ у животных разного возраста. В частности, Г. де Чавес и др. [34] в опытах на крысах показали, что животные с ОЭ в зрелом (6 мес.) и старом (18 мес.) возрасте проводили существенно меньше времени в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ), чем интактные крысы того же возраста. Т.е. проявляли большую тревожность по сравнению с контрольными животными. Время зависания в неподвижном состоянии в тесте вынужденного плавания (ВП) было значительно больше у старых крыс по сравнению с крысами среднего и молодого возраста, причем это наблюдалось в равной степени у ОЭ и интактных крыс. В работе А. Кисса и др. [35] операцию ОЭ проводили на молодых (3 мес.), зрелых (7–8 мес.) и крысах среднего возраста (12 мес.), после чего на 17-й день исследовали у них поведение в ОП, а на 24–25-й дни в тесте ВП. Каждая группа состояла из 3 подгрупп животных: с операцией ОЭ, ложно оперированных (контроль) и с операцией ОЭ и введением 17-β эстрадиола (Е2). В тесте ВП у крыс молодого и зрелого возраста операция ОЭ существенно увеличивала время пребывания в неподвижности (усиление депрессивно-подобного поведения) по сравнению с контрольными животными. Введение эстрадиола (Е2) уменьшало время неподвижности, причем до уровня даже ниже, чем у контрольных крыс. У животных среднего возраста таких различий не наблюдалось. Время пребывания в неподвижности у них было не меньше, чем у молодых и зрелых крыс, но внутри самой группы различий между ОЭ и ложно оперированными крысами не наблюдалось, а введение эстрадиола (Е2) мало влияло на время неподвижности в тесте ВП. Не было различий между группами также в тесте от-

крытого поля (ОП) [35]. В опытах Ю. Федотовой и др. [33] крысы в возрасте 16–18 мес. через 4 мес. после операции ОЭ совершали существенно меньше выходов в открытые рукава ПКЛ и проводили в них, а также в светлом отсеке светлостемной камеры меньше времени по сравнению с интактными крысами того же возраста. А. Вольф и др. [31] показали, что ОЭ у крыс в возрасте 14- и 19-и мес. усиливает тревожное поведение в тесте ОП и в светлостемной камере и депрессивно-подобное поведение в тесте ВП по сравнению с контрольными животными. Примечательно, что введение эстрадиола замещало отсутствие эстрогенов у ОЭ крыс, но только в том случае, если оно начиналось сразу после операции ОЭ, а не спустя 5 мес. после нее [31]. В работе [29] операция ОЭ у крыс в возрасте 12 мес. слабо влияла на уровень тревожного поведения в тесте ОП, уменьшая только число выходов в его центр, и не влияла на поведение в тесте ПКЛ по сравнению с контрольными животными. Введение эстрадиола увеличивало число выходов в центр ОП у ОЭ животных до уровня контрольных крыс [29]. Исследование влияния ОЭ у мышей линии C57BL/6N в препубертатном периоде (24-й день жизни) и тестировании их в позднем пубертатном возрасте (40–47-й дни) не выявило изменений в уровне тревожного и депрессивно-подобного поведения в тестах ОП, ПКЛ и ВП по сравнению с контрольными животными [28]. Но в тесте зарывания мраморных полосок (20 шт.) в гнезда глубиной 3 см мыши с ОЭ уступали интактным мышам, что как-будто говорит об уменьшении у них уровня тревожности и склонности к импульсивным реакциям. Но авторы по-другому интерпретировали полученные результаты. По их мнению, крайние проявления, т.е. полное отсутствие зарываний мрамора или, наоборот, зарывание его в полном объеме, представляют собой две разные формы тревожно-подобного фенотипа поведения — избегательного и импульсивного. В такой интерпретации мыши с ОЭ проявляли тревожный фенотип, поскольку показывали избегательное поведение [28]. В еще одной работе из той же лаборатории [27] у самок-мышей операция ОЭ на 25-й день жизни приводила в возрасте 80–90 дней не к усилению, а к ослаблению тревожно-подобного поведения по сравнению с ложно оперированными животными. Это проявилось в увеличении времени пребывания в открытых рукавах ПКЛ и в центре ОП, и в увеличении общего пройденного расстояния. Ослабление тревожного поведения авторы связывают не с анксиолитическим действием препубертатной овариоэктомии, а с растормаживанием в результате операции двигательной активности и исследовательского поведения [27].

Таким образом, в целом за небольшими исключениями, можно считать, что чем старше возраст животного, тем сильнее проявляется влияние

ОЭ на развитие тревожно-депрессивных расстройств. Это влияние практически отсутствует, если операцию ОЭ проводят в пубертатный (до полового созревания) период, но оно хорошо выражено у грызунов среднего возраста, соответствующего около- и менопаузному периодам у женщины, и в старом возрасте. В последнем случае, однако, различия в уровне тревожного и депрессивно-подобного поведения у ОЭ и контрольных животных часто не наблюдаются, а высокий уровень их проявления связан с влияниями возраста.

Влияние овариоэктомии в зависимости от времени, прошедшего с момента операции. В работе [22] поведение крыс линии Вистар исследовали через 1, 3, 6, 9, 12 и 15 нед. после операции ОЭ, которую проводили в возрасте 3-х месяцев. Контролем служили нормальные крысы, которых тестировали в фазы проэструса (максимальный уровень эстрогенов) и метэструса-диэструса (минимальный уровень), а также ОЭ крысы, но с замещающим (эстрогены) влиянием эстрадиола (Е2). Все группы крыс с ОЭ проводили меньше времени и совершали меньше выходов в открытые рукава ПКЛ по сравнению с контрольными животными. Индекс тревожности был выше у ОЭ крыс. В тесте ВП время зависания в неподвижности у ОЭ крыс было больше, чем у контрольных животных при тестировании через 6, 12 и 15 нед. после ОЭ. Интересно, что у крыс с интервалом в 1 нед. после операции, тревожно-подобное поведение было выражено слабее, чем у крыс с интервалом в 3 и более недель, но сильнее, чем у контрольных крыс, получавших введение эстрадиола. Примерно, то же самое наблюдалось в тесте ВП, когда при малых интервалах (1 и 3 нед.) после ОЭ не было различий во времени зависания в неподвижности у ОЭ крыс по сравнению животными, получавшими введение эстрадиола. Авторы объясняют эти результаты компенсаторной активацией надпочечных желез, которые нивелируют низкую концентрацию стероидных гормонов в малые промежутки времени после операции ОЭ. В другой работе на мышах [25] депрессивно-подобное поведение в тесте ВП проявилось только у самок с ОЭ при больших интервалах между операцией и тестированием (6 и 12 нед.), и в тесте “подвешивания” за хвост через 12 нед. При постоперационном интервале до начала тестирования в 1 неделю различий не наблюдалось в обоих тестах. В тесте предпочтения сахарозы разницы в поведении у ОЭ и контрольной групп животных не было ни при одном из интервалов времени между операцией и тестированием [25]. Однако имеются работы, в которых различия в тесте ВП между ОЭ и контрольной группами проявлялись при небольших интервалах (1–2 нед.) [26, 36–38] и не проявлялись при больших интервалах (3–4 мес.) [38, 39]. Существенное влияние на депрессивно-по-

добное поведение крыс среднего возраста в зависимости от времени между операцией и тестированием обнаружилось под влиянием эстрогенов (этинил эстрадиола, ЕЕ2) и антидепрессантов (цитопрама, ингибитора обратного захвата серотонина) [30]. Введение эстрадиола (Е2) уменьшало время неподвижности в тесте ВП при постоперационном интервале в 1, но не 3 нед. Цитопрам самостоятельно не влиял на время неподвижности, но в комбинации с эстрадиолом, оказывал антидепрессантный эффект при интервале между операцией ОЭ и началом тестирования в 1, но не 3 нед.

Таким образом, интервал времени между операцией ОЭ и началом тестирования играет существенную роль в проявлениях эффектов ОЭ. Чтобы влияние ОЭ начало проявляться, необходимо определенное время после операции. Обычно одну неделю занимает постоперационное восстановление. Но дальше требуется не менее 3-х (а лучше больше) недель, чтобы эффекты ОЭ начали проявляться, хотя, как отмечалось выше, и из этого правила бывают исключения.

Влияние овариоэктомии в комбинации с хроническим стрессом. М. Хайям и др. [40] исследовали влияние ОЭ совместно с хроническим умеренным стрессом на проявление тревожного и депрессивно-подобного поведения в тестах ОП и ВП. Операцию ОЭ проводили у крыс линии Вистар в возрасте 9–12 нед. Через 2 нед. после операции крыс подвергали хроническому умеренному стрессу с 17-го по 64-й дни. Тесты проводили дважды, до начала и после окончания процедуры предъявления хронического стресса. В тесте открытого поля ОЭ не влияла на уровень тревожно-подобного поведения по сравнению с контрольными животными ни до, ни после предъявления хронического стресса. В тесте ВП депрессивно-подобное поведение проявилось через 2 мес. после ОЭ при втором тестировании крыс (после стресса), но не проявилось при первом тестировании (до стресса), через две недели после ОЭ [40]. Следовательно, прибавление к ОЭ хронического умеренного стресса не влияло на уровень тревожности крыс, но вызывало у них депрессивно-подобное поведение. В опытах на мышах Р. Эйд и др. [21] исследовали влияние ОЭ и эстрогенов в комбинации с хроническим непредсказуемым стрессом на депрессивно-подобное поведение в тестах “подвешивания” за хвост, ВП и предпочтения сахарозы. Операцию ОЭ проводили в возрасте 3-х месяцев, а затем в течение 47 дней у мышей разных групп исследовали влияние эстрадиола и агонистов эстрогеновых α и β рецепторов на поведение мышей. С 28-го дня мышей делили на 2 группы, одну подвергали хроническому непредсказуемому стрессу, другую не подвергали. В тесте “подвешивания” за хвост, ОЭ вызывала увеличение времени неподвижности по сравнению с ложно оперированной группой, как совместно с

хроническим непредсказуемым стрессом, так и без него. Введение эстрогенов и агонистов эстрогеновых рецепторов уменьшало влияние ОЭ, но только у группы мышей, не получавших хронический непредсказуемый стресс. В тестах ВП и предпочтения сахарозы, ни одна из групп животных (с ОЭ и введением эстрогенов, с хроническим стрессом или без него) не проявляла признаков депрессивно-подобного поведения. Таким образом, влияние ОЭ (совместно с хроническим непредсказуемым стрессом или без него) на депрессивно-подобное поведение зависело от характера тестов, используемых для оценки этого поведения [21]. В работе Ф. Ге и др. [41] крысы линии Спрейг-Дуули через неделю после операции ОЭ подвергались процедуре хронического непредсказуемого стресса продолжительностью в 6 недель. Между 6-й и 7-й нед. проводили тесты в ПКЛ, ОП, ВП и предпочтения сахарозы. В последнем тесте меньше всего сахарозы потребляла группа крыс с совместным влиянием ОЭ и хронического непредсказуемого стресса, затем группы крыс только с ОЭ и только с хроническим непредсказуемым стрессом. Эти группы крыс пили достоверно меньше раствора сахарозы по сравнению с контролем, но при сравнении их между собой существенных различий не наблюдалось. В тесте ПКЛ число выходов и время пребывания в открытых рукавах лабиринта было наименьшим у крыс группы ОЭ + хронический стресс и у группы только с хроническим стрессом. Различия между этими группами и контролем были достоверными. Группа крыс с ОЭ занимала промежуточное положение, но различия между ней и остальными группами были недостоверными. В ОП достоверные различия проявились только между группой ОЭ + хронический стресс и контрольными животными и только по показателю времени пребывания в центре ОП. В тесте ВП наибольшее время в неподвижности проводила группа крыс с ОЭ + хронический стресс. Примерно одинаковое время проводили группы крыс только с ОЭ и только с хроническим непредсказуемым стрессом, в обоих случаях различия с контрольной группой были достоверными. Таким образом, прибавление хронического непредсказуемого стресса к ОЭ усиливало проявления депрессивно-подобного поведения в тесте ВП и предпочтения сахарозы. В тесте ПКЛ операция ОЭ сама по себе не влияла на уровень тревожно-подобного поведения, но совместное влияние ОЭ с хроническим непредсказуемым стрессом усиливало уровень тревожности по сравнению с контрольными животными. В тесте ОП время нахождения в центре было достоверно меньше у группы ОЭ + хронический стресс, чем у контрольных животных [41]. В работе [42] у 2-х месячных мышей линии C57BL/6J исследовали влияние ОЭ в отдельности и совместно с субхроническим вариативным стрессом (1 ч в день, 6 дн.) на тревожное

и депрессивно-подобное поведение. По сравнению с контрольными животными уровень кортикостерона был выше только у мышей, подверженных совместному влиянию ОЭ и субхронического вариативного стресса. Во всех тестах только прибавление субхронического стресса к ОЭ достоверно ухудшало поведенческие показатели по сравнению с контрольными животными. А именно, в тесте предпочтения сахарозы мыши этой группы меньше других пили сладкий раствор сахарозы, хотя мыши ОЭ группы по этому показателю не отличались от контрольных животных. То же самое наблюдалось в тесте подвешивания за хвост, ВП и ОП. В первых двух тестах время пребывания в неподвижности было наибольшим у группы ОЭ + субхронический стресс, а в тесте ОП у этой группы было наименьшее пройденное расстояние. Показатели ОЭ группы мышей во всех тестах не отличались от показателей контрольных ложно оперированных животных [42]. В одной из работ [43] у крыс линии Вистар исследовали влияние бактериального провоспалительного липополисахарида (ЛПС) в отдельности и совместно с ОЭ на развитие тревожного и депрессивно-подобного поведения. В тесте ВП крысы групп с ОЭ, ЛПС и ОЭ + ЛПС проводили достоверно больше времени в неподвижности, чем контрольные животные. Больше всех время неподвижности было у крыс группы ОЭ + ЛПС, затем у ЛПС и затем у ОЭ групп. В тесте ОП все три группы значительно уступали контрольным животным по числу выходов в центр ОП, времени проведенному в центре, и пройденной дистанции, хотя различия между самими группами были небольшими. Похожая картина наблюдалась в тесте ПКЛ.

Таким образом, добавление к овариоэктомии хронических стрессов разной природы в основном усугубляло тревожное и депрессивно-подобное поведение, хотя в отдельных случаях, несмотря на синергичное влияние, аддитивных эффектов хронического стресса получить не удалось. Влияние совместного действия ОЭ и хронического стресса зависело от характера используемых тестов, вида животных, их возраста и типа применяемых стрессов.

Заместительная роль эстрогенов у овариоэктomированных животных. Выше мы уже приводили данные о заместительной функции эстрогенов у животных, перенесших операцию ОЭ, и их предохранительной роли в развитии тревожно-депрессивных расстройств. Надо сказать, что практически во всех работах эстрогены, вводимые животным с ОЭ, предохраняли или значительно ослабляли возникновение у них тревожного и депрессивно-подобного поведения. В частности, в опытах на мышях с ОЭ было показано, что введение 17β -эстрадиола (Е2) (3, 10 и 30 мкг/кг) за 1 ч до начала теста ВП существенно уменьшало время пребы-

вания животных в неподвижности, т.е. эстрадиол вызывал антидепрессантный эффект [44]. В тесте “подвешивания” за хвост спустя 32–34 дня после операции ОЭ введение эстрадиола (Е2) в дозах 10, 100 и 1000 мкг/кг уменьшало время пребывания мышей в неподвижном состоянии до контрольного уровня, который был в два раза ниже, чем у ОЭ животных [45]. Аналогичные результаты были получены на ОЭ мышах при введении синтетического эстрогена, 17α -этинил эстрадиола (ЕЕ2) (0.3 и 1 мкг/кг и 0.03, 0.1 и 1 мг/кг) в тестах ВП и “подвешивания” за хвост [46]. Эстрадиол (Е2) оказывал анксиолитический и антидепрессантный эффекты у мышей с ОЭ при интрацеребровентрикулярном (1 мкг/кг) и подкожном введении (50 мкг/кг) в тестах ОП и “подвешивания” за хвост [47]. Введение эстрадиола (Е2) вызывало антидепрессантный эффект у ОЭ крыс в тесте ВП при остром (1 дн.) и хроническом (7 и 14 дн.) введении [48]. Показано, что в зависимости от влияния на разные эстрогеновые рецепторы ($ER\alpha$ или $ER\beta$) эстрадиол вызывал разные эффекты. Так, введение агонистов $ER\beta$ вызывало у крыс анксиолитические и антидепрессантные эффекты, а агонистов $ER\alpha$ -анксиогенные эффекты [49, 50]. О том, что антидепрессантное влияние эстрадиола (Е2) реализуется через активацию $ER\beta$, дополнительно свидетельствуют данные, полученные на нокаутных мышах с отсутствием гена, кодирующего активность $ER\beta$ (BERKO мыши) [51]. У нокаутных ОЭ мышей введение эстрадиола не уменьшало время пребывания в неподвижном состоянии в тесте ВП. При введении агонистов $ER\beta$ снижалась активность ГГНС и уменьшался уровень кортикостерона, а при введении агонистов $ER\alpha$ уровень кортикостерона, наоборот, повышался. В работе Ф. Ян и др. [52] введение ОЭ крысам 10 мкг эстрадиола (Е2) и селективного модулятора $ER\beta$, диарилпропионитрила (diarylpropionitrile, DPN, 10 мкг) увеличивало число выходов в центр ОП и время пребывания в открытых рукавах ПКЛ, а в тесте ВП уменьшало время неподвижности. Т.е. эстрадиол и DPN оказывали анксиолитическое и антидепрессантное действие. Введение агониста $ER\alpha$, пропилпиразол триола (propylpyrazole triol, PPT) такого эффекта не вызывало [52]. У крыс с операцией ОЭ в молодом (2–4 мес.) и среднем (12–14 мес.) возрасте введение эстрадиола (Е2), флуоксетина и эстрадиола совместно с флуоксетином уменьшало время неподвижности, увеличивало время плавания и карабканий по стенкам цилиндра в тесте ВП [53]. Совместное введение Е2 и флуоксетина увеличивало потребление раствора сахарозы на фоне хронического умеренного стресса, причем у крыс среднего возраста это увеличение проявилось на 2 нед. раньше, чем у молодых крыс. Т.е. совместное введение эстрадиола и флуоксетина оказыва-

ло антидепрессантное действие независимо от характера стресса и возраста животного.

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ОВАРИОЭКТОМИИ И ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ

*Овариоэктомия, гипоталамо-гипофизарная
надпочечниковая система и эстрогены*

В ряде работ было показано, что эстрадиол увеличивает реактивность ГГНС в ответ на стресс, что может быть следствием ослабления обратной отрицательной глюкокортикоидной связи на паравентрикулярное ядро гипоталамуса [49, 54]. У самок грызунов овариоэктомия снижала секрецию кортикостерона и АКТГ в ответ на стресс, а введение эстрадиола возвращало секрецию этих гормонов к контрольному уровню [49, 55]. Введение агониста $ER\beta$, DPN значительно уменьшало реакции кортикостерона и АКТГ на стресс [56]. Такой же эффект вызывался при прямом введении DPN в паравентрикулярное ядро гипоталамуса [57]. Эти данные свидетельствуют о том, что активация $ER\beta$ выполняет функцию смягчения чрезмерной активации ГГНС под влиянием разных стрессоров [54]. В других работах, однако, эстрогены оказывали тормозное влияние на реакции ГГНС [58] в ответ на стресс, или вообще не оказывали эффекта [59]. Наблюдаемые расхождения в полученных результатах связывают с разной дозировкой и длительностью применения эстрадиола; разным временем, прошедшим с момента овариоэктомии до введения эстрадиола; и возможностью влияния эстрадиола на разные эстрогеновые рецепторы ($ER\alpha$ и $ER\beta$), оказывающие противоположное влияние на регуляцию ГГНС [60]. Необходимо помнить, что поскольку гормоны надпочечников могут влиять на экспрессию $ER\beta$, то наряду с эффектами ослабления обратной отрицательной глюкокортикоидной связи они могут изменять $ER\beta$ сигналинг в структурах ГГНС. В частности, было показано, что введение дексаметазона ОЭ крысам усиливает экспрессию $ER\beta$ в паравентрикулярном ядре гипоталамуса [61, 62], а адреналэктомия, напротив, уменьшает уровень экспрессии эстрогеновых β -рецепторов в этом ядре. Введение кортикостерона восстанавливало экспрессию mRNA $ER\beta$ [61]. В противоположность действию агонистов $ER\beta$ на стресс-индуцируемую секрецию глюкокортикоидов, введение агониста $ER\alpha$, пропилпиразол триола (propylpyrazole triol, PPT) усиливало реакции кортикостерона и АКТГ на ограничительный стресс [49, 56, 57, 63]. Введение PPT также увеличивало стресс-индуцируемую c-fos mRNA экспрессию в паравентрикулярном ядре гипоталамуса [57]. В работе [49] были обнаружены $ER\alpha$ в ГАМК-эргических нейро-

нах около паравентрикулярного ядра гипоталамуса, а эстрадиол, действуя на этом уровне, блокировал отрицательную обратную регуляцию активности ГГНС, вызванную дексаметазоном. Другими словами, функция эстрогеновых α -рецепторов может заключаться в торможении обратной отрицательной глюкокортикоидной связи с помощью ГАМК-эргических нейронов, расположенных около паравентрикулярного ядра гипоталамуса, и таким образом поддерживать высокий тонус ГГНС. По мнению Дж. Лью и др. [64] $ER\alpha$ -чувствительные нейроны вносят свой вклад в базовый уровень активности ГГНС, а активность этой системы в периоды стрессов зависит от нейронов с рецепторами обоих типов ($ER\alpha$ и $ER\beta$).

Овариоэктомия, нейровоспаление и эстрогены

Показано, что стероидные гормоны яичников влияют на выработку и биологическую активность провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 и IL-6 [65]. У крыс после операции ОЭ наблюдалось увеличение выработки провоспалительных цитокинов. Были повышены уровни цитокинов IL-1 β и IL-18 в гиппокампе [66], и IL-1 β , TNF- α , IL-6 — в гипоталамусе [67, 68]. Увеличивалось также число активированных микроглиальных клеток в префронтальной коре [41]. Прибавление к ОЭ хронического непредсказуемого стресса на протяжении 6 недель усиливало активность провоспалительных и проокислительных молекул (IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS, и CX3CR1) и уменьшало активность противовоспалительного фактора *Arg1* и фактора *CD200*, отрицательно регулирующего микроглиальные клетки [41]. ОЭ вызывала дегградацию I κ B (inhibitor of nuclear factor kappa B) и усиливала экспрессию и фосфорилиацию p65, что свидетельствует об активации NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) сигналинга и переключения микроглиальной поляризации от противовоспалительного M2 к провоспалительному M1 фенотипу, контролирующего транскрипцию провоспалительных цитокинов [69]. Недавно было показано, что эстрадиол (E2) снижает депрессивно-подобное поведение у старых (но не у молодых) мышей-самок в ответ на липополисахаридный (ЛПС) челендж через активацию E2/ $ER\alpha$ /SIRT1/NF- κ B сигнальных путей [70]. Различия в проявлениях депрессивно-подобного поведения у молодых и старых самок были связаны с разной активацией этих путей. Развитие депрессивно-подобного поведения и увеличение уровня цитокина IL-6 и транскрипционного фактора NF- κ B в гиппокампе крыс в результате операции ОЭ объяснялось нехваткой эстрогенов [71]. Влияние овариэктомии было очень схоже с действием провоспалительного бактериального токсина, ЛПС. Как операция ОЭ, так и введение ЛПС, вызывало “болезненное состояние” (sickness be-

havior) — общее недомогание, вялость, повышение температуры и т.д. В работе [43] было показано, что операция ОЭ и введение ЛПС вызывают тревожное и депрессивно-подобное поведение сходным образом. Причем крысы с ОЭ + ЛПС проявляли более высокий уровень такого поведения, чем группы животных только с ОЭ или только с введением ЛПС. При этом наблюдалось существенное увеличение цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-6 в гипоталамусе у ОЭ крыс по сравнению с ложно оперированными животными [67]. Но в сыворотке крови и жировой ткани у крыс ЛПС группы выше был только уровень цитокина IL-1 β , но не TNF- α и IL-6. Введение эстрадиола (E2) ОЭ крысам среднего возраста (перорально 30 мкг/кг на протяжении 10 нед.) наряду с антидепрессантным эффектом вызывало up regulation ER α и ER β в гиппокампе. Кроме того, ослаблялись индуцируемые овариоэктомией апоптоз и нейрональные повреждения, регуляция AMPK/NF- κ B сигнальных путей, уменьшалась концентрация провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α , а также iNOS и COX-2 в гиппокампе крыс [72]. Е. Сюй и др. [73] показали, что у ОЭ крыс депрессивно-подобное поведение вызывалось за счет снижения уровня серотонина и увеличения уровней энзима IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase), IFN- γ , IL-6, TLR-4 (toll like receptor) и фосфорилированного транскрипционного фактора NF- κ B (субъединица p65) в гиппокампе, но не в префронтальной коре. Энзим IDO служит посредником между нейровоспалением и серотонинергической системой. Он индуцируется провоспалительными цитокинами и катализирует деградацию триптофана и превращение его в кайнуренин (kynurenine). Расщепление триптофана, в свою очередь, приводит к уменьшению серотонина в мозге. Таким образом, гиперэкспрессия энзима IDO, расщепляя триптофан и уменьшая синтез серотонина в мозге, может быть одним из механизмов развития депрессивно-подобного поведения. Торможение энзима IDO предупреждало развитие депрессивно-подобного поведения под влиянием острого или хронического нейровоспалительного процесса [74]. Введение эстрадиола (E2) ослабляло депрессивно-подобное поведение и восстанавливало нейрохимические изменения в гиппокампе ОЭ крыс [73]. В другой работе [75] овариоэктомия наряду с увеличением провоспалительных цитокинов приводила к гиперэкспрессии инфламماسомы NLRP3, принимающей активное участие в нейровоспалительном процессе. Инфламماسома способствует созреванию и секреции провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18. Введение ОЭ мышам ингибитора инфламماسомы, VX-765 смягчало тревожное и депрессивно-подобное поведение и уменьшало концентрации цитокинов IL-1 β и IL-18 в гиппокампе. Такой же эффект оказывали введение эстрадиола (E2) и агонистов эстрогеновых β ,

но не α -рецепторов. Авторы полагают, что дефицит эстрогенов в результате операции ОЭ вызывает активацию инфламماسомы NLRP3, которая приводит к нейровоспалению в гиппокампе, усилению тревожности и развитию депрессивно-подобного поведения [75].

Таким образом, операция ОЭ приводит к возникновению тревожного и депрессивно-подобного поведения через формирование процесса нейровоспаления, как одного из возможных механизмов для развития негативного состояния. Об этом свидетельствует увеличение уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-18 и TNF α) в гиппокампе и гипоталамусе, переключения микроглиальной поляризации от противовоспалительного M2 к провоспалительному M1 фенотипу, контролирующего транскрипцию провоспалительных цитокинов. Введение эстрогенов возвращает отмеченные биохимические изменения к контрольным значениям через активацию эстрогеновых β , но не α -рецепторов.

Овариоэктомия, оксид азота и эстрогены

Один из возможных механизмов антидепрессантного действия эстрогенов у ОЭ животных связан с их влиянием на сигнальные пути L-аргинина/оксида азота/cGMP (cyclic guanosine monophosphate) [44]. Оксид азота (NO) вырабатывается из L-аргинина с помощью синтазы оксида азота (NOS). Показано, что торможение NOS в гиппокампе крыс вызывает антидепрессантный эффект [76, 77] за счет снижения уровня гуанозин монофосфата и (сGMP) и NO под влиянием ингибиторов NOS [78, 79]. У ОЭ мышей спустя 10 дней после операции введение эстрадиола (3, 10 и 30 мкг/кг) отдельно и в комбинации с неспецифическим ингибитором NOS, L-NAME и селективным ингибитором нейрональной nNOS, 7-NI вызывало существенное уменьшение времени неподвижности в тесте ВП [44]. Введение ОЭ животным предшественника NO, L-аргинина и сGMP селективного ингибитора фосфодиэстеразы 5 силденафила за полчаса до введения E2 блокировало антидепрессантный эффект эстрадиола. Такие же результаты были получены в тестах ВП и “подвешивания” за хвост у ОЭ мышей после введения синтетического 17 α -этинил эстрадиола совместно с L-NAME или 7-NI [46].

Овариоэктомия, моноаминоэргические системы и эстрогены

Серотонин. Мы уже вкратце касались влияния овариоэктомии на серотонинергическую систему. Это влияние может осуществляться через разные механизмы, например, через изменение активности транспортера серотонина [37, 53] или посредством действия на фермент IDO, который

является посредником между серотонинергической системой и нейровоспалительным процессом [73]. В работе [80] введение эстрадиола (Е2) непосредственно в поле СА3 гиппокампа овариоэктомированным крысам вызывало два эффекта. С одной стороны, замедлялся процесс клиренса серотонина, с другой, тормозилась способность флувоксамина (ингибитор обратного захвата серотонина) замедлять процесс клиренса серотонина. Авторы полагали, что эти разнонаправленные эффекты в ответ на системное введение эстрадиола реализуются через разные типы эстрогеновых рецепторов. Антидепрессантный эффект (замедление клиренса серотонина) вызывался, по их мнению, благодаря активации $ER\beta$ и/или GPR30 (эстрогеновый рецептор, связанный с G протеином) под влиянием агонистов DPN для $ER\beta$ и G1 для GPR30. Наоборот, блокада тормозного эффекта флувоксамина на клиренс серотонина проходила через активацию $ER\alpha$, о чем свидетельствовало влияние агониста $ER\alpha$, PPT [81]. В последующей работе [82] авторы показали, что замедление процесса клиренса серотонина (реализуемое через $ER\beta$) под влиянием эстрадиола или DPN блокировалось в результате торможения MAPK/ERK1/2, но не PI3K/Akt сигнальных путей. Этот эффект осуществлялся во взаимодействии с TrkB и IGF-1 рецепторами. Ослабление, вызванного флувоксамином замедления процесса клиренса серотонина (реализуемое через $ER\alpha$), блокировалось в результате торможения как MAPK/ERK1/2, так PI3K/Akt сигнальных путей. Это происходило во взаимодействии с рецептором IGF-1 и с метаболитным глутаматным рецептором 1, но не с TrkB [82]. Помимо влияния на активность транспортера серотонина эстрогеновые β -рецепторы участвуют также в процессах синтеза серотонина, через влияние на активность триптофан гидроксилазы 1 и 2 (см. подробно в обзоре [83]). Показано, что системное введение DPN и эстрадиола (Е2) значительно усиливало экспрессию *tph2* mRNA в каудальной и средне-дорзальной области дорзальных ядер шва [84]. Э. Эстрада-Камарена и др. [85] показали, что антидепрессантный эффект эстрогенов реализуется через активацию 5-НТ 1А ауторецепторов, поскольку введение антагониста этих рецепторов, WAY100635 блокировало антидепрессантный эффект. Хроническое введение ингибиторов обратного захвата серотонина приводило к десенситизации пресинаптических 5-НТ1А ауторецепторов, восстанавливало частоту разрядов серотонинергических нейронов в ядрах шва и усиливало высвобождение серотонина в нейронных терминалях [86]. Хроническое введение эстрадиола (Е2) также усиливало частоту разрядов серотонинергических нейронов в дорзальных ядрах шва [87]. Но в отличие от ингибиторов обратного захвата серотонина, при хроническом введении эстрадиола требовалось меньше време-

ни для эффекта десенситизации серотониновых ауторецепторов (1 нед. против 3-х нед.). Острое и хроническое введение эстрадиола усиливало экспрессию 5-НТ 2А рецепторов в церебральной коре и прилежащем ядре [88, 89]. Таким образом, антидепрессантный эффект эстрадиола вызывался как при стимулировании постсинаптических 5-НТ 2А рецепторов, так и при снижении активности пресинаптических 5-НТ1А ауторецепторов в префронтальной коре и ядрах шва. В обоих случаях происходило усиление разрядной активности серотонинергических нейронов и повышенное высвобождение серотонина [88].

Норадреналин. В отличие от большого числа данных о связи эстрогенов с серотонином, информации о влиянии эстрогенов на норадренергическую систему мозга значительно меньше. Известно, что эстрогены вызывают усиленный оборот и высвобождение норадреналина в гипоталамусе [90]. Э. Эстрада-Камарена и др. [85] показали, что введение антагониста $\alpha 2$ адренергических рецепторов, айдаксозена (idaxozan) блокирует антидепрессантный эффект эстрогенов. Овариоэктомия у крыс существенно снижала оптическую плотность DBH-ir (dopamine- β -hydroxylase) (энзим, который катализирует переход дофамина в норадреналин) волокон и количество $\alpha 1$ -адренорецепторов и $ER \alpha$ -позитивных нейронов в преоптической области гипоталамуса по сравнению с ложно оперированными животными [91]. Эти изменения нормализовались у группы ОЭ крыс, получавших хроническое (4 нед.) введение эстрадиола (Е2). Количество DBH- и $ER\alpha$ -позитивных нейронов в голубом пятне уменьшалось у ОЭ крыс по сравнению с ложно оперированными животными, но у ОЭ + эстрадиол группы оно возвращалось к контрольным значениям [91]. Введение ингибитора обратного захвата норадреналина, венлафаксина (venlafaxine) (10 мг/кг перорально на протяжении 4 нед.) ОЭ крысам вызывало более сильный антидепрессантный эффект, если оно начиналось через 24 ч после ОЭ, нежели через 2 нед. после операции [92]. Поведенчески антидепрессантный эффект венлафаксина заключался в уменьшении времени неподвижности в тесте ВП у ОЭ крыс. На клеточно-молекулярном уровне венлафаксин индуцировал эритропоэтин (erythropoietin, EPO) и mRNA экспрессию EPO рецептора, увеличивал уровни p-JAK2 (phospho-Janus kinase 2), фосфо-сигнального трансдучера и активатора транскрипции 5 и фосфо-внеклеточной сигнально-регулируемой киназы 1/2 в гиппокампе ОЭ крыс. Венлафаксин также уменьшал активность каспазы 3 и фактора некроза опухоли альфа, увеличивал уровни BDNF в гиппокампе и эстрадиола в сыворотке крови. Другими словами, препарат оказывал нейропротекторный эффект у

ОЭ крыс благодаря активации ЕРО/ЕРОR/JAK2 сигнальных путей, противоапоптотической и противовоспалительной активности, а также за счет улучшения нейротрофической функции и роста выработки эстрогенов [92].

Дофамин. К. Сюй и др. [71] показали участие дофаминовых D3 рецепторов в проявлениях тревожного и депрессивно-подобного поведения, модулируемого эстрогенами. В их опытах на нокаутных мышах с отсутствием гена D3 рецепторов (D3KO) и овариоэктомией за 4 недели до поведенческих тестов было исследовано влияние хронического (9 дн.) введения эстрадиола (E2) (0.2 мг/кг) на тревожное и депрессивно-подобное поведение. В светлом отсеке светло-темной камеры D3KO мыши по сравнению с контрольными животными больше двигались, больше переходили из отсека в отсек, имели большую скорость движения и проходили большую дистанцию, но время пребывания их в светлом отсеке было примерно таким же, как у контрольных животных. Введение эстрадиола еще больше увеличивало различия между обеими группами. В тесте ВП время пребывания в неподвижности у D3KO мышей было существенно больше, чем у контрольных животных. Хроническое введение эстрадиола значительно уменьшало время неподвижности в тесте ВП у D3KO мышей [71]. Ю. Федотова и Н. Ордян [93] показали, что введение антагониста D1 рецепторов, уменьшало время пребывания в неподвижности крыс с ОЭ, а в комбинации SCH-23390 с эстрадиолом (E2) оно было еще меньшим по сравнению с контрольным введением физ.раствора. Агонист D1 рецепторов, SKF-38393 не влиял на время пребывания ОЭ крыс в неподвижности, но блокировал антидепрессантный эффект эстрадиола. В другой работе [39] антагонист D1 рецепторов, SCH-23390 самостоятельно и в комбинации с эстрадиолом (E2) вызывал у ОЭ крыс анксиолитический эффект в тестах светло-темной камеры и ОП. Введение эстрадиола увеличивало высвобождение дофамина в центральном ядре миндалины у ОЭ крыс [94]. Под влиянием эстрадиола и агониста ER β , DPN происходило усиление активности D2 рецепторов в стриатуме и прилежащем ядре и транспортера дофамина в стриатуме у ОЭ крыс [95].

Таким образом, по меньшей мере, три типа дофаминовых рецепторов участвуют в замещающих эффектах эстрогенов у ОЭ крыс.

Овариоэктомия, трофические факторы и эстрогены

Накоплено много данных, согласно которым эстрогены влияют на активность трофических факторов (прежде всего BDNF), а те в свою оче-

редь, противодействуют развитию тревожного и депрессивно-подобного поведения за счет активного влияния на нейрогенез, пролиферацию и выживаемость вновь рожденных клеток в зубчатой фации гиппокампа. У ОЭ крыс было обнаружено проявление депрессивно-подобного поведения и уменьшение уровня BDNF в гиппокампе, но не в префронтальной коре [96]. При этом экспрессия TrkB, высоко родственного BDNF рецептора существенно не изменялась под влиянием ОЭ ни в гиппокампе, ни в префронтальной коре. Введение эстрадиола (2) ослабляло депрессивно-подобное поведение и повышало уровень BDNF в гиппокампе ОЭ крыс. Уровни E2 и BDNF в сыворотке крови позитивно коррелировали между собой [96]. Такие же результаты были получены у крыс с последствиями постинсультной депрессии, выявленной в тестах предпочтения сахарозы и ВП [97]. Эстрогенная терапия в течение 2-х нед. заметно улучшала неврологические симптомы и увеличивала экспрессию BDNF в гиппокампе. Введение эстрадиола (E2) ОЭ мышам, испытывавшим хронический вариабельный умеренный стресс, смягчало депрессивно-подобное поведение и усиливало экспрессию BDNF в префронтальной коре [98]. В зубчатой фации ОЭ крыс ограничительный стресс существенно увеличивал уровень BDNF у группы животных, получавших введение эстрадиола (за 53 ч до стресса) и прогестерона (за 5 ч до стресса), но уменьшал уровень BDNF при введении контрольного раствора (кунжутного масла) [99]. У ОЭ крыс, испытывавших социальный стресс, было усилено депрессивно-подобное поведение в тесте ВП, увеличены уровни кортикостерона и АКГГ в сыворотке крови, но значительно снижена концентрация BDNF по сравнению с контрольными животными [100]. Эти изменения, однако, возвращались к исходным значениям под влиянием эстрадиола (2). Введение эстрадиола (E2) вызывало ослабление депрессивно-подобного поведения и усиление уровня BDNF в гиппокампе у крыс молодого, зрелого и среднего возраста [35]. Недавно У. Сакума и др. [101] показали влияние нового селективного модулятора эстрогеновых рецепторов, BE360 на проявления депрессивно-подобного поведения ОЭ мышей, подвергнутых субхроническому стрессу. Введение BE360 уменьшало депрессивно-подобное поведение у ОЭ + стресс мышей, увеличивало уровни BDNF, фосфорилированного p-CREB и Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 – регулятор протеинов, управляющих процессом апоптоза) в гиппокампе. Существенно увеличивалось также число BrdU/DCX положительных клеток в зубчатой фации гиппокампа. Авторы высказали предположение, что BE360 вызывает антидепрессантный эффект через стимулирование нейрогенеза гиппокампа посредством активации CREB/BDNF, Bcl-2 сигнальных путей [101].

Овариоэктомия, нейрогенез и эстрогены

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что инъекции эстрадиола после ишемического инсульта существенно усиливают нейрогенез — увеличают число вновь рожденных нейронов в субвентрикулярной зоне и облегчают миграцию новых клеток к ишемическим областям [102]. Введение эстрадиола (2 нед.) (E2) спустя 3 нед. после окклюзии средней церебральной артерии оказывало антидепрессантное действие у ОЭ крыс с постинсультной депрессией, оцененной в тестах ВП и предпочтения сахарозы [103]. У ишемических крыс, получавших эстрадиол, было также увеличено число BrdU (bromodeoxyuridine)- и DCX (doublecortin)-позитивных клеток в зубчатой фасции гиппокампа и субвентрикулярной зоне по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует об участии нейрогенеза гиппокампа в антидепрессантном действии эстрадиола [103]. В другой работе, также на модели ишемического инсульта у ОЭ мышей линии C57BL/6J, хроническое введение эстрадиола вызывало значительное увеличение числа вновь рожденных нейронов в дорзальной (но не в вентральной) части субвентрикулярной зоны [104]. Пролиферативное действие эстрадиола ограничивалось нейрональными предшественниками и не влияло на глиоз. Влияние эстрадиола на нейрогенез реализовалось через эстрогеновые α и β рецепторы, поскольку выключение каждого из этих рецепторов блокировало способность эстрадиола усиливать нейрогенез [104]. У ОЭ крыс совместное введение подпороговых доз флуоксетина и эстрадиола (E2) и введение их по отдельности в оптимальных дозах вызывало антидепрессантный эффект при тестировании животных в тесте ВП [105]. Кроме того происходило усиление клеточной пролиферации в гиппокампе, увеличение числа помеченных DCX незрелых нейронов и усложнения их дендритного дерева, что в целом указывает на связь отмеченных морфогистологических изменений с антидепрессантными эффектами флуоксетина и эстрадиола. Повторное введение эстрадиола в течение 15 дней после инъекции BrdU (200 мг/кг) уменьшало у ОЭ крыс выживаемость вновь рожденных нейронов, усиливало клеточную пролиферацию и уменьшало общее число погибших клеток в зубчатой фасции гиппокампа [106].

Таким образом, овариоэктомия у грызунов самостоятельно или в комбинации с ишемическим инсультом может приводить к депрессивно-подобному поведению, в которое определенным вклад вносит снижение нейрогенеза в гиппокампе и субвентрикулярной области. Заместительная терапия эстрадиолом (E2) восстанавливает нейрогенез и ослабляет депрессивно-подобное поведение.

Итак, обзор приведенных выше данных позволяет сделать заключение о том, что двухсторонняя овариоэктомия у крыс и мышей может служить хорошей моделью для оценки тревожно-депрессивных расстройств в около- и менопаузные периоды жизни у женщин. Причем очень важно, в каком возрасте осуществляется ОЭ, и сколько времени проходит с момента проведения операции до начала тестирования поведения. Наиболее чувствительными к развитию тревожного и депрессивно-поведения поведения оказываются ОЭ животные среднего возраста, который соответствует около- и менопаузному периодам жизни женщины. Влияние ОЭ практически не обнаруживается, если операция проводится до периода полового созревания (в пре- и пубертатный периоды), а при совершении операции в старом возрасте, хотя влияние ОЭ такое же, как в среднем возрасте, оно существенно не отличается от эффектов у ложно оперированных животных. Это говорит больше о влиянии старого возраста на развитие тревожно-депрессивных расстройств, чем о влиянии, вызванном недостатком стероидных гормонов в результате операции ОЭ, которых и так уже мало в этом возрасте. Заместительная терапия эстрогенами оказывается более эффективной у ОЭ животных в молодом и/или зрелом, но не в более позднем возрасте. Причем, она более эффективна в том случае, если начинает проводиться сразу после ОЭ, а не спустя несколько недель или месяцев после нее. Важную роль в проявлениях тревожного и депрессивно-подобного поведения у ОЭ животных играет интервал времени от момента операции до начала тестирования поведения. При малых интервалах (1–2 нед.) времени отрицательного влияния ОЭ на поведение либо вообще не наблюдается, либо может быть даже реверсивным, т.е. проявляться в виде антитревожных и антидепрессантных эффектов, что связывают с компенсаторными реакциями надпочечных желез, которые нивелируют низкую концентрацию стероидных гормонов в малые промежутки времени после операции. Обычно требуется не менее 3-х недель после операции, чтобы ОЭ стала вызывать тревожное и депрессивно-подобное поведение. Часто эффекты ОЭ исследуют совместно с влиянием разных форм хронического или субхронического стресса. Это делается для того, чтобы оценить возможность купирования тревожно-депрессивных расстройств у ОЭ животных под влиянием совместного и/или изолированного действия эстрадиола (E2), агонистов эстрогеновых α и β -рецепторов и классических антидепрессантов. Добавление к овариоэктомии хронических стрессов в основном усугубляет тревожное и депрессивно-подобное поведение, хотя в отдельных случаях, несмотря на синергичное влияние, аддитивных эффектов стресса получить

не удастся. Эффекты совместного влияния ОЭ и хронического стресса зависят от характера используемых тестов, вида животных, их возраста и типа применяемых стрессов. Заместительная терапия эстрогенами практически всегда предохраняет или значительно ослабляет проявления тревожного и депрессивно-подобного поведения у ОЭ грызунов. Это происходит при введении естественного (17 β -эстрадиола) и синтетического (17 α -этинил эстрадиола, ЕЕ2) эстрадиола, при его острых и хронических инъекциях, при подкожном и интрацеребровентрикулярном введении, при малых (10 мкг/кг) и больших (1 мг/кг) дозах эстрогенов. В зависимости от влияния на эстрогеновые α - или β -рецепторы эстрадиол (Е2) и его агонисты вызывают разные эффекты. Введение агонистов эстрогеновых β -рецепторов приводит к анксиолитическим и антидепрессантным эффектам, а агонистов эстрогеновых α -рецепторов — к анксиогенным эффектам.

В одном из наших ранних обзоров [7] мы детально описали механизмы развития тревожно-депрессивных расстройств в результате расстройства (“поломок”) функций разных уровней деятельности здорового мозга — от нарушения работы целостных функциональных систем до abortивных гормональных, биохимических, молекулярно-клеточных и иных преобразований. Не случайно стероидные половые гормоны, и прежде всего эстрогены, естественным образом (функционально) вклиниваются в эти механизмы, действуя синхронно на заинтересованные и вовлеченные звенья каждого уровня. Отметим, что, прежде всего под влиянием эстрадиола усиливается реактивность ГНС, которая может быть следствием ослабления обратной отрицательной глюкокортикоидной связи на паравентрикулярное ядро гипоталамуса. Но имеются и противоположные результаты, которые объясняются влиянием эстрадиола на эстрогеновые α -рецепторы, которые оказывают обратное влияние на регуляцию ГНС. Существует очень тесная связь между действием эстрогенов и нейровоспалительным процессом, который сегодня многими рассматривается, как один из вероятных патогенетических механизмов развития тревожно-депрессивных расстройств. Под влиянием ОЭ происходит значительное увеличение уровней провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 и IL-6 в гипоталамусе и IL-1 β и IL-18 в гиппокампе. Наоборот, введение эстрадиола или агонистов эстрогеновых β -рецепторов возвращает этот уровень к нормальным значениям. Под влиянием ОЭ существенно увеличивается экспрессия инфламماسомы NLRP3, которая принимает активное участие в нейровоспалительном процессе. Усиливается также экспрессия фермента IDO, который является посредником между нейровоспалением и серотонинергической системой мозга. Этот фермент индуцируется провоспалительными

ми цитокинами и катализирует деградацию триптофана и превращение его в кайнуренин. В результате уменьшается синтез серотонина, недостаток которого, как известно, является одним из патогенетических звеньев в механизмах развития тревожного и депрессивно-подобного поведения. Введение эстрадиола (Е) непосредственно в поле СА3 гиппокампа замедляет процесс клиренса серотонина благодаря активации эстрогеновых β -рецепторов. Этот процесс блокируется в результате торможения MAPK/ERK1/2 сигнальных путей во взаимодействии с IGF-1 рецептором и с метаболитным глутаматным рецептором 1. Эстрадиол через эстрогеновые β -рецепторы влияет также на синтез серотонина, регулируя активность триптофан гидроксилазы 1 и 2. Антидепрессантный эффект эстрадиола вызывается при стимулировании постсинаптических 5-HT 2A рецепторов и при снижении активности пресинаптических 5-HT1A ауторецепторов в префронтальной коре и ядрах шва. Эстрогены усиливают оборот и высвобождение норадреналина в гипоталамусе. Антидепрессантный эффект реализуется через активацию α 1- и α 2 адренорецепторов, регуляцию активности транспортера норадреналина и фермента дофамин- β -гидроксилазы, который катализирует переход дофамина в норадреналин. Эстрогены влияют на тревожное и депрессивно-подобное поведение также через модуляцию активности дофаминовых D1, D2 и D3 рецепторов. Недостаток эстрогенов у ОЭ у крыс вызывает значительное снижение уровня BDNF в гиппокампе, а введение эстрадиола (Е2) возвращает этот уровень к нормальным значениям. Отмечается положительная связь между концентрациями эстрадиола и BDNF в сыворотке крови. Увеличение концентрации BDNF противодействует развитию тревожного и депрессивно-подобного поведения за счет активного влияния на нейрогенез, пролиферацию и выживаемость вновь рожденных клеток в зубчатой фасции гиппокампа. Стимулирование нейрогенеза гиппокампа под влиянием эстрогенов реализуется через активацию BDNF/CREB, Bcl-2 сигнальных путей.

Таким образом, природа создала у самок два мощных физиологических механизма борьбы с развитием тревожно-депрессивных расстройств. Первый из них [8, 9] связан со слабой реактивностью иммунной системы и нейровоспалительного процесса у самок в ответ на первый стресс в жизни. Запуск воспалительного процесса в ответ на ранний стресс характеризуется сенситизацией системы нейровоспаления, которую называют еще праймингом (priming). Сенситизация системы нейровоспаления у самцов и самок проходит по-разному. В то время как у самцов ранний стресс и рост уровня кортикостерона ведет к усилению активности иммунной системы, проявляемой в форме повышенной реактивности микроглии, у самок этот процесс либо вообще не влияет

на реактивность микроглии, либо проявляется в форме небольших абберантных изменений. При повторных стрессах у самцов из-за прайминга вызываются чрезмерные и часто неадекватные реакции со стороны ГГНС и других систем организма. У самок все протекает значительно мягче и слабее. Второй механизм связан с активностью у самок стероидных половых гормонов (эстрогенов), которые выполняют защитную, предохранительную роль в развитии тревожно-депрессивных расстройств. Не случайно, с ослаблением активности половых гормонов, в связи с возрастом (менопауза) или при удалении яичников утрачивается защитная роль эстрогенов, и, как результат, возникает всплеск тревожно-депрессивных расстройств, что мы и попытались обобщить в настоящем обзоре.

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

- Albert K.M., Boyd B.D., Taylor W.D., Newhouse P.A. // J. Affect. Disord. 2021. V. 293. P. 355–362.
- Jia X., Gao Z., Hu H. // Sci. China Life Sci. 2021. V. 64. № 6. P. 911–925.
- Troubat R., Barone P., Leman S., Desmidt T., Cressant A., Atanasova B., Brizard B., El Hage W., Surget A., Belzung C., Camus V. // Eur. J. Neurosci. 2021. V. 53. № 1. P. 151–171.
- Pitsillou E., Bresnehan S.M., Kagarakis E.A., Wijoyo S.J., Liang J., Hung A., Karagiannis T.C. // Mol. Biol. Rep. 2020. V. 47. № 1. P. 753–770.
- Григорьян Г.А., Гуляева Н.В. // Журн. высш. нерв. деят.-сти. 2015а. V. 65. № 6. P. 643–660.
- Stepanichev M.Yu., Dygalo N.N., Grigoryan G.A., Shishkina G., Gulyaeva N.V. // BioMed. Research International. 2014. 1–20 (ID932757).
- Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В. // Успехи физ. наук. 2014. V. 44. № 2. P. 3–20.
- Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В., Григорьян Г.А. // Журн. высш. нерв. деят.-сти. 2020. V. 70. № 2. P. 259–276.
- Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Груздева В.А., Григорьян Г.А. // Физиол. журн. 2020. V. 106. № 7. P. 823–842.
- Fonken L.K., Frank M.G., Gaudet A.D., D'Angelo H.M., Daut R.A., Hampson E.C., Ayala M.T., Watkins L.R., Maier S.F. // Brain Behav. Immun. 2018. V. 70. P. 257–267.
- Bekhhbat M., Neigh G.N. // Brain Behav. Immun. 2018. V. 73. P. 149–150.
- Григорьян Г.А., Гуляева Н.В. // Журн. высш. нерв. деят.-сти. 2015. V. 65. № 1. P. 19–32.
- Dalla C., Edgecomb C., Whetstone A.S., Shors T.J. // Neuropsychopharm. 2008. V. 33. № 7. P. 1559–1569.
- Dennerstein L., Guthrie J.R., Clark M., Leher P., Henderson V.W. // Menopause. 2004. V. 11. № 5. P. 563–568.
- Farquar C.M., Harvey S.A., Yu Y., Sadler L., Stewart A.W. // Am. J. Obstet. Gynecol. 2006. V. 194. № 3. P. 711–717.
- Rohl J., Kjerulff K., Langenberg P., Steege J. // Am. J. Obstet. Gynecol. 2008. V. 199. P. 22.e1–22.e5.
- Stute P., Spyropoulou A., Karageorgiou V., Cano A., Bitzer J., Ceausu I., Chedraui P., Durmusoglu F., Erkola R., Goulis D.G., Lindén Hirschberg A., Kiesler L., Lopes P., Pines A., Rees M., van Trotsenburg M., Zervas I., Lambrinoudaki I. // Maturitas. V. 2020. № 131. P. 91–101.
- Maki P.M., Kornstein S.G., Joffe H., Bromberger J.T., Freeman E.W., Athappilly G., Bobo W.V., Rubin L.H., Koleva H.K., Cohen L.S., Soares C.N. // J. Womens Health (Larchmt). 2019. V. 28. № 2. P. 117–134.
- Soares C.N. // Drugs Aging. 2013. V. 30. № 9. P. 677–685.
- O'Hara M.W., McCabe J.E. // Annu. Rev. Clin. Psychol. 2013. V. 9. P. 379–407.
- Eid R.S., Lieblich S.E., Duarte-Guterman P., Chaiton J.A., Mah A.G., Wong S.J., Wen Y., Galea L.A.M. // Horm. Behav. 2020. V. 119. P. 104651.
- Puga-Olguín A., Rodríguez-Landa J.F., Roviroso-Hernández M.J., Germán-Ponciano L.J., Caba M., Meza E., Guillén-Ruiz G., Olmos-Vázquez O.J. // Behav. Brain Res. 2019. V. 360. P. 185–195.
- da Silva Moreira S.F., Medeiros L.F., de Souza A., de Oliveira C., Scarabelot V.L., Fregni F., Caumo W., Torres I.L. // Life Sci. 2016. V. 145. P. 233–239.
- Schoenrock S.A., Oreper D., Young N., Ervin R.B., Bogue M.A., Valdar W., Tarantino L.M. // Physiol. Behav. 2016. V. 167. P. 404–412.
- Bastos C.P., Pereira L.M., Ferreira-Vieira T.H., Drummond L.E., Massensini A.R., Moraes M.F., Pereira G.S. // Psychoneuroendocrinology. 2015. V. 57. P. 14–25.
- Bekku N., Yoshimura H., Araki H. Psychopharmacology (Berl.) 2006. V. 187. P. 170–180.
- Delevich K., Hall C.D., Piekarski D., Zhang Y., Wilbrecht L. // Horm. Behav. 2020. V. 118. P. 104641.
- Boivin J.R., Piekarski D.J., Wahlberg J.K., Wilbrecht L. // Psychoneuroendocrinology. 2017. V. 85. P. 78–87.
- Renczés E., Borbélyová V., Steinhardt M., Höpfner T., Stehle T., Ostatníková D., Celec P. // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2020. V. 11. P. 570560.
- Vega-Rivera N.M., Gallardo Tenorio A., Fernández-Guasti A., Estrada-Camarena E. Pharmaceuticals (Basel). 2016. V. 9. № 2. P. 21–33.
- Walf A.A., Paris J.J., Frye C.A. // Psychoneuroendocrinology. 2009. V. 34. № 6. P. 909–916.

32. *Fernández-Guasti A., Olivares-Nazario M., Reyes R., Martínez-Mota L.* // Pharmacol Biochem Behav. 2017. V. 152. P. 81–89.
33. *Fedotova J.O.* // BMC Med Genet. 2019. V. 20 (Suppl. 1). P. 49.
34. *de Chaves G., Moretti M., Castro A.A., Dagostin W., da Silva G.G., Boeck C.R., Quevedo J., Gavioli E.C.* // Physiol. Behav. 2009. V. 97. № (3–4). P. 420–425.
35. *Kiss A., Delattre A.M., Pereira S.I., Carolino R.G., Szawka R.E., Anselmo-Franci J.A., Zanata S.M., Ferraz A.C.* // Behav. Brain Res. 2012. V. 227. № 1. P. 100–108.
36. *Benmansour S., Arroyo L.D., Frazer A.* // Front. Aging Neurosci. 2016. V. 8. P. 1–13.
37. *Ibrahim W.W., Safar M.M., Khattab M.M., Agha A.M.* Psychoneuroendocrinology. 2016. V. 74. P. 240–250.
38. *Estrada-Camarena E., López-Rubalcava C., Hernández-Aragón A., Mejía-Mauries S., Picazo O.* // J. Psychopharmacol. 2011. V. 25. P. 1365–1377.
39. *Fedotova J.* Biomed. Res. Int. 2014. 847821.
40. *Khayum M.A., Moraga-Amaro R., Buwalda B., Koole M., den Boer J.A., Dierckx R.A.J.O., Doorduyn J., de Vries E.F.* // J. Psychoneuroendocrinology. 2020. V. 115. P. 104610.
41. *Ge F., Yang H., Lu W., Shi H., Chen Q., Luo Y., Liu L., Yan J.* // Biomed. Res. Int. 2020. 3609758.
42. *Iqbal J., Ma X.M.* Neuroreport. 2020. V. 31. № 3. P. 213–219.
43. *Azizi-Malekabadi H., Hosseini M., Pourganji M., Zabihi H., Saeedjalali M., Anaigoudari A.* // Neurol. Res. Int. 2015. 627642.
44. *Heydarpour P., Salehi-Sadaghiani M., Javadi-Paydar M., Rahimian R., Fakhfouri G., Khosravi M., Khoshkish S., Gharedaghi M.H., Ghasemi M., Dehpour A.R.* Horm. Behav. 2013. V. 63. № 2. P. 361–369.
45. *Bernardi M., Vergoni A.V., Sandrini M., Tagliavini S., Bertolini A.* Physiol. Behav. 1989. V. 45. № 5. P. 1067–1068.
46. *Saeedi Saravi S.S., Arefidoust A., Yafthian R., Saeedi Saravi S.S., Dehpour A.R.* // Psychopharmacology (Berl). 2016. V. 233. № 8. P. 1467–1485.
47. *Wada T., Sameshima A., Yonezawa R., Morita M., Sawakawa K., Tsuneki H., Sasaoka T., Saito S.* // PLoS One. 2018. V. 13. № 12. e0209859.
48. *Nowakowska E., Kus K.* // Arzneimittelforschung. 2005. V. 55. № 3. P. 153–159.
49. *Weiser M.J., Wu T.J., Handa R.J.* // Endocrinology. 2009. V. 150. P. 1817–1825.
50. *Walf A.A., Frye C.A.* // Pharmacol Biochem. Behav. 2007. V. 86. P. 407–414.
51. *Rocha B.A., Fleischer R., Schaeffer J.M., Rohrer S.P., Hickey G.J.* // Psychopharmacology (Berl). 2005. V. 179. № 3. P. 637–643.
52. *Yang F., Tao J., Xu L., Zhao N., Chen J., Chen W., Zhu Y., Qiu J.* // Neuroreport. 2014. V. 25. № 2. P. 100–104.
53. *Récamier-Carballo S., Estrada-Camarena E., Reyes R., Fernández-Guasti A.* // Behav. Brain Res. 2012. V. 233. № 2. P. 351–358.
54. *Handa R.J., Weiser M.J.* // Front. Neuroendocrinol. 2014. V. 35. № 2. P. 197–220.
55. *Handa R.J., Burgess L.H., Kerr J.E., O'Keefe J.A.* // Horm. Behav. 1994. V. 28. № 4. P. 64–476.
56. *Lund T.D., Rovis T., Chung W.C., Handa R.J.* // Endocrinology. 2005. V. 146. P. 797–807.
57. *Lund T.D., Hinds L.R., Handa R.J.* // J. Neurosci. 2006. V. 26. P. 1448–1456.
58. *Ochedalski T., Subburaju S., Wynn P.C., Aguilera G.* // J. Neuroendocrinol. 2007. V. 19. P. 189–197.
59. *Babb J.A., Masini C.V., Day H.E., Campeau S.* // Neuroscience. 2013. V. 234. P. 40–52.
60. *Young E.A., Altemus M., Parkison V., Shastri S.* // Neuropsychopharmacology. 2001. V. 25. P. 881–891.
61. *Isgor C., Cecchi M., Kabbaj M., Akil H., Watson S.J.* // Neuroscience. 2003. V. 121. № 4. P. 837–845.
62. *Suzuki S., Handa R.J.* // Endocrinology. 2004. V. 145. P. 3658–3670.
63. *Serova L.I., Harris H.A., Maharjan S., Sabban E.L.* // J. Endocrinol. 2010. V. 205. P. 253–262.
64. *Liu J., Bisschop P.H., Eggels L., Foppen E., Fliers E., Zhou J.N., Kalsbeek A.* // Endocrinology. 2012. V. 153. № 7. P. 3337–3344.
65. *Nordell V.L., Scarborough M.M., Buchanan A.K., Sohrabji F.* // Neurobiol. Aging. 2003. V. 24. № 5. P. 733–743.
66. *Wang Y., Xu Y., Sheng H., Ni X., Lu J.* // Behav. Brain Res. 2016. V. 307. P. 18–24.
67. *Iwasa T., Matsuzaki T., Tungalagsuvd A., Munkhzaya M., Kawami T., Kato T., Kuwahara A., Yasui T., Irahara M.* // J. Neuroimmunol. 2014. V. 277. № (1–2). P. 50–56.
68. *Iwasa T., Matsuzaki T., Kinouchi R., Gereltsetseg G., Murakami M., Munkhzaya M., Altankhuu T., Kuwahara A., Yasui T., Irahara M.* // Cytokine. 2014. V. 65. № 1. P. 65–73.
69. *Wu B., Song Q., Zhang Y., Wang C., Yang M., Zhang J., Han W., Jiang P.* // Lipids Health Dis. 2020. V. 19. № 1. P. 4.
70. *Jiang X., Chen Z., Yu X., Chen J., Sun C., Jing C., Xu L., Liu F., Ni W., Chen L.* // Neurochem. Int. 2021. V. 148. 105097.
71. *Xu K., Li P., Miao Y., Dong N., Zhang J., Wei S., Li S., Cao F.* // Physiol. Behav. 2019. V. 198. P. 11–17.
72. *Zhang W.Y., Guo Y.J., Wang K.Y., Chen L.M., Jiang P.* // Int. Immunopharmacol. 2020. V. 86. 106734.
73. *Xu Y., Sheng H., Tang Z., Lu J., Ni X.* // Behav. Brain Res. 2015. V. 288. P. 71–78.
74. *O'Connor J.C., Lawson M.A., André C., Moreau M., Lestage J., Castanon N.* // Mol. Psychiatry 2009. V. 14. P. 511–522.
75. *Xu Y., Sheng H., Bao Q., Wang Y., Lu J., Ni X.* // Brain Behav. Immun. 2016. V. 56. P. 175–186.
76. *Wang D., An S.C., Zhang X.* // Neurosci. Lett. 2008. V. 433. P. 59–64.
77. *Joca S.R., Guimaraes F.S.* // Psychopharmacology (Berl). 2006. V. 185. P. 298–305.
78. *Heiberg I.L., Wegener G., Rosenberg R.* // Behav. Brain Res. 2002. V. 134. P. 479–484.
79. *Harkin A.J., Bruce K.H., Craft B., Paul I.A.* // Eur. J. Pharmacol. 1999. V. 372. P. 207–213.

80. Benmansour S., Piotrowski J.P., Altamirano A.V., Frazer A. // *Neuropsychopharmacol.* 2009. V. 34. P. 555–564.
81. Benmansour S., Weaver R.S., Barton A.K., Adeniji O.S., Frazer A. // *Biol. Psychiatry.* 2012. V. 71. P. 633–641.
82. Benmansour S., Privratsky A.A., Adeniji O.S., Frazer A. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014. V. 17. № 5. P. 765–777.
83. Osterlund M.K. // *Biochim Biophys. Acta.* 2010. V. 1800. № 10. P. 1136–1144.
84. Donner N., Handa R.J. // *Neuroscience.* 2009. V. 163. № 2. P. 705–718.
85. Estrada-Camarena E., López-Rubalcava C., Vega-Rivera N., Récamier-Carballo S., Fernández-Guasti A. // *Behav. Pharmacol.* 2010. V. 21. № 5–6. P. 451–464.
86. Blier P., de Montigny C. // *Neuropsychopharmacology.* 1999. V. 21. P. 91–98.
87. Robichaud M., Debonnel G. // *J. Neuroendocrinol.* 2005. V. 17. P. 179–185.
88. Osterlund M.K., Witt M.R., Gustafsson J.A. // *Endocrine.* 2005. V. 28. № 3. P. 235–242.
89. Sumner B.E., Grant K.E., Rosie R., Hegele-Hartung C., Fritzemeier K.H., Fink G. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999. V. 73. P. 119–128.
90. Etgen A.M., Karkanias G.B. // *Psychoneuroendocrinology.* 1994. V. 19. P. 603–610.
91. Wang W., Bai W., Cui G., Jin B., Wang K., Jia J., Da Y., Qin L. *Neuroendocrinology.* 2015. V. 101. № 2. P. 120–132.
92. Saad M.A., El-Sahar A.E., Sayed R.H., Elbaz E.M., Helmy H.S., Senousy M.A. // *Neurotherapeutics.* 2019. V. 16. № 2. P. 404–415.
93. Fedotova J., Ordyan N. // *Acta Physiol. Hung.* 2011. V. 98. № 2. P. 165–176.
94. Liu B., Xie J. // *J. Neurochem.* 2004. V. 90. P. 654–658.
95. Le Saux M., Morissette M., Di Paolo T. // *Neuropharmacology.* 2006. V. 50. P. 451–457.
96. Lu J., Xu Y., Hu W., Gao Y., Ni X., Sheng H., Liu Y. *Neurosci. Lett.* 2014. V. 573. P. 13–18.
97. Su Q., Cheng Y., Jin K., Cheng J., Lin Y., Lin Z., Wang L., Shao B. // *Exp. Ther. Med.* 2016. V. 12. № 3. P. 1843–1848.
98. Karisetty B.C., Joshi P.C., Kumar A., Chakravarty S. // *Neuroscience.* 2017. V. 356. P. 89–101.
99. Franklin T.B., Perrot-Sinal T.S. // *Psychoneuroendocrinology.* 2006. V. 31. № 1. P. 38–48.
100. Al-Rahbi B., Zakaria R., Othman Z., Hassan A., Ahmad A.H. // *Scientific World J.* 2014. 310821.
101. Sakuma W., Nakagawasa O., Nemoto W., Odaira T., Ogawa T., Ohta K., Endo Y., Tan-No K. // *Behav. Brain Res.* 2020. V. 393. 112764.
102. Li J., Siegel M., Yuan M., Zeng Z., Finnucan L., Persky R., Hurn P.D., McCullough L.D. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2011. V. 31. № 2. P. 413–425.
103. Cheng Y., Su Q., Shao B., Cheng J., Wang H., Wang L., Lin Z., Ruan L., ZhuGe Q., Jin K. // *Biomed. Res. Int.* 2013. 392434.
104. Suzuki S., Gerhold L.M., Böttner M., Rau S.W., Dela Cruz C., Yang E., Zhu H., Yu J., Cashion A.B., Kindy M.S., Merchenthaler I., Gage F.H., Wise P.M. // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 500. № 6. P. 1064–1075.
105. Vega-Rivera N.M., Fernández-Guasti A., Ramírez-Rodríguez G., Estrada-Camarena E. // *Psychoneuroendocrinology.* 2015. V. 57. P. 113–124.
106. Barker J.M., Galea L.A. // *Neuroscience.* 2008. V. 152. № 4. P. 888–902.

Ovariectomy as a Model of Anxiety-Depressive Disorders

G. A. Grigoryan

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

In the current review the data on ovariectomy in rodents as a convenient model for assessment of anxiety-depressive disorders in women at peri- and menopause periods of life are described. At the first part of the review the influence of ovariectomy on development of anxious and depressive-like behavior depending on an animal's age, time of surgery, beginning of testing after surgery, a character of the tests used is considered. The attention is also drawn to the influence of ovariectomy together with a chronic stress and substitutionary function of estrogens in ovariectomized animals. The second part is devoted to the mechanisms of ovariectomy influence and substitutionary estrogenic therapy on development and prevention of anxious and depressive-like behavior. There are considered the behavioral, hormonal, biochemical, molecular-cellular mechanisms and intracellular signaling of estrogen actions in ovariectomized animals. The role of the hypothalamo-pituitary adrenal axis, neuroinflammation/immune system, nitric oxide, monoaminergic systems, trophic factors, neurogenesis, intracellular signaling, etc in these mechanisms is discussed.

Keywords: ovariectomy, anxiety, depression, estrogens, forced swimming, an elevated plus maze, sucrose preference, neuroinflammation, stress, BDNF, neurogenesis

Памяти академика Игоря Петровича Ашмарина посвящается

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КРЕАТИНА И ЕГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

© 2022 г. Л. С. Нерсесова¹, М. С. Петросян¹, А. В. Арутюнян², *

¹Институт молекулярной биологии НАН Республики Армения, Ереван, Армения

²Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 03.08.2021 г.

После доработки 17.08.2021 г.

Принята к публикации 18.08.2021 г.

В научной литературе накоплен обширный массив данных, свидетельствующий о нейропротекторном потенциале креатина (Кр). Однако, несмотря на то, что экспериментальные и клинические исследования последних лет подтверждают полученные ранее нейропротекторные терапевтические эффекты Кр, по ряду заболеваний получены неоднозначные клинические результаты. Целью данного обзора является, с одной стороны, обобщение экспериментальных данных, однозначно указывающих на эффективность нейропротекторного действия Кр, и, с другой стороны, обсуждение последних неоднозначных данных соответствующих клинических испытаний, а также перспектив терапевтического и профилактического применения Кр. Как следует из обсуждения представленного материала преимуществ Кр, как пищевой добавки, не ограничиваются применением его при высокоинтенсивных и реабилитационных физических упражнениях, а могут иметь более широкое применение как среди здоровых людей, так и различных клинических групп пациентов. Несмотря на неоднозначные данные ряда клинических испытаний большинство исследователей уверены в том, что дальнейшие исследования с усовершенствованными протоколами подтвердят нейропротекторный терапевтический потенциал Кр при нейродегенеративных заболеваниях, хотя уже сегодня можно говорить о подтвержденной эффективности Кр при болезни Хантингтона, а также травматических повреждениях мозга. Многообещающими кажутся данные о положительном терапевтическом действии Кр на отдельные психические заболевания, как например депрессии, посттравматическое стрессовое расстройство, фибромиалгии. Очевидно, что протекторный потенциал Кр, как природного адаптогена, не раскрыт полностью и список областей его терапевтического и профилактического применения будет расширен на основании активно ведущихся в настоящее время работ.

Ключевые слова: креатин, нейропротекторное действие, нейродегенеративные и психические заболевания, когнитивные способности, нераскрытый потенциал креатина

DOI: 10.31857/S1027813322010095

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

L-аргинин: глицин амидинтрансфераза (АГАТ)
болезнь Альцгеймера (БА)
биполярное расстройство (БР)
боковой амиотрофический склероз (БАС)
болезнь Хантингтона (БХ)
болезнь Паркинсона (БП)
гамма-аминомасляная кислота (ГАМК)
гематоэнцефалический барьер (ГЭБ)
гуанидинацетат-метилтрансфераза (ГАМТ)
креатин (Кр)

креатинфосфат (КФ)
креатинкиназа (КК)
креатин-креатинфосфат-креатинкиназная система (Кр-КФ-КК)
митохондриальная креатинкиназа (мит-КК)
мозговой изофермент креатинкиназы (ВВ-КК)
мышечный изофермент креатинкиназы (ММ-КК)
окислительное фосфорилирование (ОФ)
посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР)
сердечный изофермент креатинкиназы (МВ-КК)
транспортер Кр (тКр)
цитоплазматическая креатинкиназа (цит-КК)
электронная транспортная цепь (ЭТЦ)

* Адресат для корреспонденции: 197110 Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3, тел. +78122300049, e-mail: alexaruti-unjan@gmail.com.

В научной литературе накопился обширный массив данных, который подтверждает эффективность креатина (Кр), как пищевой добавки, при различных патологиях и состояниях организма. Высокая эргогоническая эффективность Кр в качестве спортивной добавки считается научно доказанной и, вот уже несколько десятилетий, Кр — одна из наиболее используемых спортивных добавок [1, 2]. Кр способствует повышению адаптации к физическим нагрузкам в процессе тренировок и эффективному восстановлению после них, а также увеличению мышечной массы, содействуя таким образом достижению высоких спортивных результатов [2]. Недавние работы подтвердили эргогенную эффективность Кр при тренировках военного персонала в фитнес-залах, а также улучшение его когнитивных и психомоторных функций, состояния костной ткани, нейромышечной функции и профилактики мышечных повреждений. Креатина моногидрат включен в официальные рекомендации по нутритивно-метаболической поддержке военнослужащих, выполняющих специальные операции, подводных пловцов, армейских спортсменов [3]. Для более подробного и глубокого ознакомления с эргогоническими свойствами Кр можно рекомендовать обзоры Р. Крейдера и соавт. [2] и Б. Гуалано и соавт. [4].

Весомым основанием для возрастания популярности Кр в качестве биологической добавки в последние два десятилетия послужило обнаружение протекторной роли Кр при целом ряде патологий, включая нейродегенеративные, онкологические и ревматические заболевания, подростковую депрессию, миопатии, диабет 2 типа, остеоартриты и фибромиалгии, ишемии мозга и сердечной мышцы. Установлено, что Кр положительно влияет на течение беременности, а также старение, нарушение терморегуляции, процессы реабилитации. При этом необходимо отметить, что сотни опубликованных работ и опыт миллионов пользователей Кр как пищевой добавки свидетельствуют об исключительной безопасности его применения [2, 5]. Однако, несмотря на то, что экспериментальные и клинические исследования последних лет подтверждают потенциальные терапевтические эффекты Кр, как пищевой добавки, в ходе клинических испытаний по некоторым заболеваниям были получены неоднозначные результаты. Так например, в ходе первых фаз масштабных клинических испытаний было продемонстрировано благоприятное терапевтическое действие Кр при таких нейродегенеративных заболеваниях, как болезнь Хантингтона (БХ) и Паркинсона (БП) [5–8]; к сожалению, последующие клинические исследования не подтвердили эти выводы [9, 10].

Целью данного обзора является, с одной стороны, обобщение экспериментальных данных, однозначно указывающих на эффективность нейро-

протекторного действия Кр, и, с другой стороны, обсуждение последних неоднозначных данных соответствующих клинических исследований, а также перспектив терапевтического и профилактического применения Кр.

В научной биографии академика РАМН, заслуженного профессора МГУ, генерал-майора медицинской службы И.П. Ашмарина был этап, когда он, будучи заведующим кафедрой биохимии ЛГУ им. А.А. Жданова, заинтересовался исследованием роли креатин-креатинфосфат-креатинкиназной (Кр-КФ-КК) системы в функциональной активности фагоцитов [11, 12]. Однако наиболее яркой страницей в его научной деятельности была разработка лекарственного средства Семакс, относящегося к классу регуляторных пептидов и обладающего ноотропным, нейропротекторным, психостимулирующим, антиоксидантным и антигипоксическим эффектами, направленными на повышение адаптации человека в экстремальных условиях, а также стимулирование умственной и физической работоспособности [13]. Как следует из материала, изложенного ниже, в основе многофакторного нейропротекторного действия Кр и Семакса есть одинаковые механизмы реализации его, как например, снижение глутаматной эксайтотоксичности, антиоксидантное и прямое мембранопротекторное действие [2, 4–8, 13].

ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ КР-КФ-КК СИСТЕМЫ. ОБОСНОВАНИЕ ГИПОТЕЗЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА КР И МЕХАНИЗМОВ ЕГО ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ

После выяснения ключевой роли Кр-КФ-КК системы в энергетическом гомеостазе клетки, ее участия в нивелировании последствий окислительного стресса и апоптоза, а также эксайтотоксического действия глутамата, факторов, которые вовлечены в нейропатологические процессы, стали очевидными точки соприкосновения нейропатологических процессов и процессов, лежащих в основе физиологической роли Кр в клетке, что послужило основанием для выдвижения гипотезы нейропротекторного действия Кр. Ниже приведен краткий обзор данных, свидетельствующих в пользу этой гипотезы.

В клетке суммарный пул Кр представлен свободным Кр и его фосфорилированной формой, креатинфосфатом (КФ), макроэргическим соединением, энергия гидролиза которого выше, чем таковая АТФ [14]. В тканях, особенно с высокими энергетическими потребностями, каковыми являются мышцы и мозг, КФ служит в качестве энергетического буфера, поддерживающего постоянный уровень АТФ в начальный период активного функционирования клетки. Перенос фосфорильной группы с КФ на АДФ с образова-

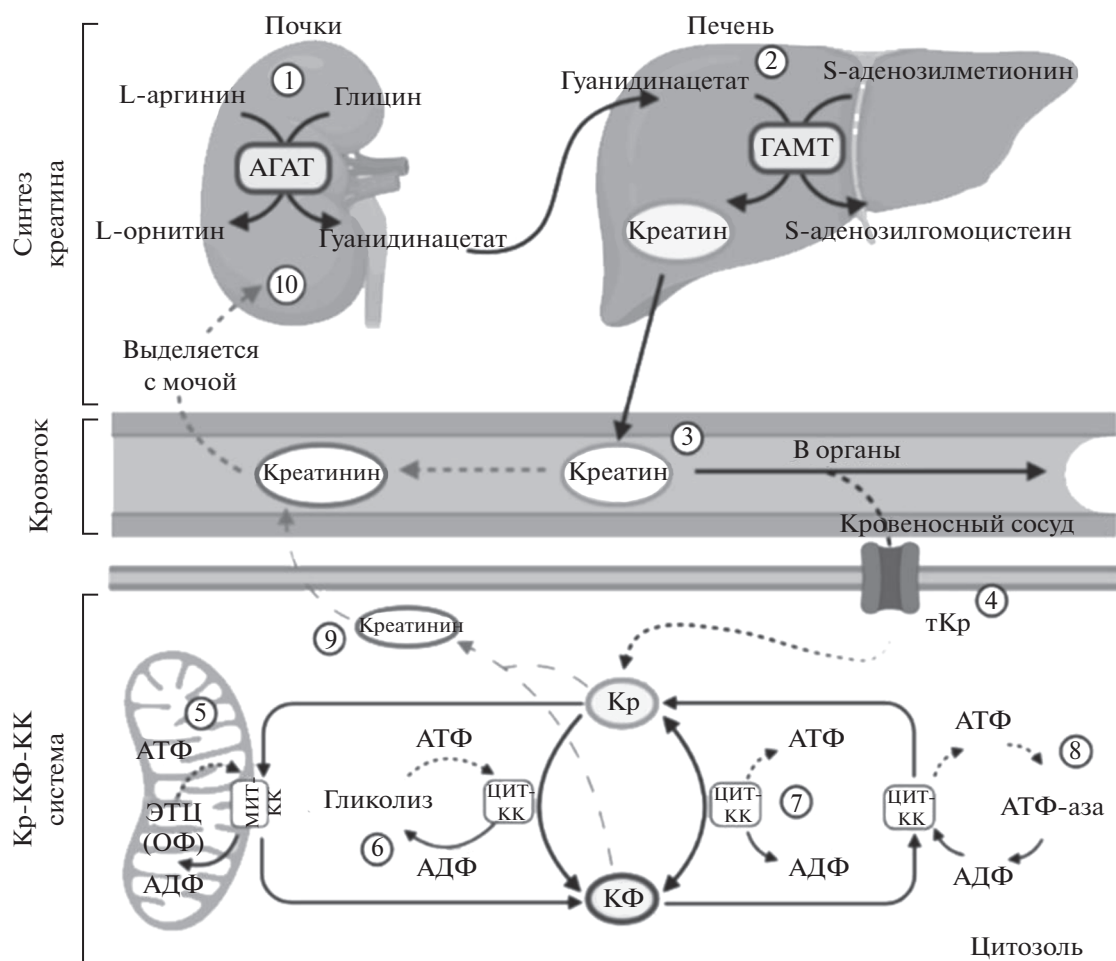


Рис. 1. Физиологическая роль креатина. (1) В почках из L-аргинина и глицина с помощью L-аргинин:глицин амидин-трансферазы (АГАТ) синтезируется гуанидинацетат. (2) Гуанидинацетат попадает в печень, где метилируется S-аденозилметионином с помощью гуанидинацетат-метилтрансферазы (ГАМТ) с образованием креатина (Кр). (3) Кр из печени высвобождается в кровоток, через который транспортируется в различные органы. (4) Клетки поглощают Кр с помощью транспортера Кр (тКр). (5) Внутриклеточный Кр может быть трансформирован в креатинфосфат (КФ) митохондриальной креатинкиназой (мит-КК), которая связана с окислительным фосфорилированием (ОФ) через электронную транспортную цепь (ЭТЦ). (6) Кр может быть превращен в КФ цитоплазматической креатинкиназой (цит-КК), связанной с гликолизом. (7) Внутриклеточный пул Кр/КФ используется для поддержания АТФ/АДФ соотношений через ресинтез АТФ. (8) Цит-КК, расположенные по всему цитозолю могут использовать запасы высокоэнергетического КФ для обеспечения энергией мест потребления АТФ или АТФ-зависимых процессов через соответствующие АТФ-азы. (9) Как Кр, так и КФ метаболизируются в креатинин через неэнзиматическую спонтанную реакцию. (10) Креатинин свободно диффундирует в кровоток и транспортируется в почки, откуда полностью выводится с мочой. Из работы [16] в нашей модификации.

нием АТФ и Кр катализируется креатинкиназой (КК), которая является важнейшим медиатором клеточного гомеостаза, поскольку в обратной реакции она катализирует превращение избытка произведенного клеткой АТФ в КФ для пополнения пула этого запасного макроэрга до очередного его использования (рис. 1). Здесь необходимо отметить, что КФ служит не только в качестве временного энергетического буфера, но и осуществляет пространственную энергетическую буферизацию, участвуя в транспорте энергии от мест ее производства, как например митохондрии, к местам ее потребления, каковыми явля-

ются миофибриллы, саркоплазматический ретикулум, клеточная мембрана и др. [15].

По субклеточной локализации различают 2 изофермента КК – димерную цитоплазматическую (цит-КК) и октамерную/димерную митохондриальную (мит-КК). В свою очередь цитоплазматические изоферменты представлены мышечной (ММ-КК), мозговой (ВВ-КК) и сердечной (МВ-КК) формами, а митохондриальные – саркомерной, характерной для поперечнополосатой мышечной ткани, и так называемой “вездесущей”, найденной в большинстве остальных тканей, включая нервную. Мит-КК может существовать в мито-

хондриях как в димерной, так и в октамерной формах и ее конформационный статус определяет ее функции и/или взаимодействие с другими митохондриальными белками. Октамерная форма обеспечивает функциональную связь с порином, белком внешней мембраны митохондрий, и с переносчиком адениновых нуклеотидов, белком внутренней мембраны, благодаря чему подавляется открытие временно проницаемых пор митохондрий, что уменьшает восприимчивость последних к апоптозу. При этом октамерная КК особенно уязвима для окислительного стресса, под воздействием которого превращается в димер, что отрицательно влияет на гомеостаз митохондриального Ca , способствует открытию временно проницаемых пор и ведет к ухудшению митохондриального дыхания [15, 17]. Особый интерес в связи с этим представляют новые данные об ассоциации ВВ-КК с мембранными структурами, такими как синаптические пузырьки и митохондрии, а также об идентификации в качестве вероятных партнеров по взаимодействию с ВВ-КК мембранных белков, членов семейства VAMP (везикуло-ассоциированных мембранных белков). Кроме того, выявлена способность АМР-активируемой протеинкиназы фосфорилировать ВВ-КК, чтобы инициировать локализацию ее на эндоплазматическом ретикулеуме в тесной близости к энергетически высокзатратному Ca^{2+} -АТФ-азному насосу. Таким образом, как считает У. Шлаттнер, мембранная локализация ВВ-КК является важной и регулируемой функцией для энергоснабжения мембрано-локализованных АТФ-зависимых процессов, подчеркивая еще раз важность локальных, нежели глобальных концентраций АТФ [17].

Как известно, мозг, который составляет примерно 2% от массы тела человека потребляет до 20% общих энергетических затрат организма [18]. Значительное количество АТФ в центральной и периферической нервной системах затрачивается на функционирование сигнальных систем, работу натриевого ионного насоса. Сохранение кальциевого гомеостаза с помощью Ca^{2+} -АТФ-азы, процессинг нейротрансмиттеров, как и аксональный и дендритный транспорт также требуют немалые затраты АТФ; при этом многочисленными исследованиями показано участие Кр-КФ-КК системы во всех вышеперечисленных процессах. Так показано, что в состоянии покоя в гиппокампальных нейронах, культивируемых в среде без сыворотки, отношение КФ/АТФ равно 15–20, а при стрессе, но в присутствии Кр, оно возрастает до 60 [15].

Следующий пул данных, служащих основанием для предположения нейропротекторного потенциала Кр, связан с данными об обширных психических расстройствах, провоцируемых истощением содержания Кр в мозге при Кр-дефицит-

ных синдромах и о частичном восстановлении этих расстройств при приеме Кр в качестве пищевой добавки. Важность Кр для нейрологических функций в норме явно демонстрируется на больных с врожденным дефицитом фермента L-аргинин:глицин-амидинотрансфераза, который ведет к аномальному снижению биосинтезу Кр. У этих пациентов отмечается задержка в развитии, экстрапирамидные расстройства и судороги; прием креатина моногидрата приводит к улучшению состояния пациентов [19, 20]. Биоэнергетическая дисфункция, а именно, нарушение отношений АТФ/АДФ и КФ/АТФ, играет важную роль в патогенезе нейродегенеративных и нейромышечных заболеваний. Так например, заметное снижение уровня АТФ в коре головного мозга было обнаружено у трансгенных мышей со смоделированным боковым амиотрофическим склерозом задолго до появления симптомов [15]. Важность слаженной работы изоферментов КК для церебральных функций наглядно демонстрируют данные, полученные на генетически модифицированных мышцах, у которых отсутствовал мозговой изофермент цитоплазматической КК: у животных отмечались дефицит поведения крыс в открытом поле, замедление обучаемости и потеря связей гиппокампальных мышечных волокон. В то же время у мышей, у которых отсутствовали в мозге как цитоплазматическая, так и митохондриальная КК, как и ожидалось, обнаруживались более серьезные нарушения, чем у мышей, нокаутированных только по гену цитоплазматической КК [15].

В последние годы стало очевидным, что Кр играет важную роль не только в биоэнергетике мозга, но может выполнять и функцию нейротрансмиттера. Показано, что Кр, как и другие гуанидиновые соединения, может влиять на ГАМК-ергическую нейротрансмиссию в качестве частичного агониста рецепторов ГАМК, что свидетельствует о нейромодуляторном действии Кр [4, 15]. Например, Л. Алмедия и сотр продемонстрировали, что Кр не только синтезируется и поглощается центральными нейронами, но также высвобождается в зависимости от потенциала действия, т.е. эксайтоксическим способом, что убедительно доказывает его роль в качестве нейромодулятора в головном мозге: при этом пресинаптический транспортер обеспечивает повторное поглощение синаптического Кр [21].

Как показали исследования пациентов с болезнью Альцгеймера (БА), а также больных с травматическими поражениями коры мозга и спинного мозга, мозговая КК относится к числу белков-мишеней, наиболее чувствительных к окислительной модификации [22].

Важными составляющими гипотезы нейропротекторного действия Кр стали присущие ему антиоксидантные антиапоптотические свойства.

В качестве примеров антиоксидантного действия Кр, можно перечислить следующие данные: защитный эффект Кр против оксидативного стресса, вызванного ультрафиолетовым облучением в кератиноцитах кожи человека [23]; цитопротекторное действие против свободных кислородных радикалов, изученное на ряде клеточных линий млекопитающих [24–26]; эффективность Кр в прямом перехвате ряда свободных радикалов, включая ABTS+ (2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат), супероксидный анион и пероксинитрит [27]. Особый интерес представляют данные о протекторном действии Кр на различного рода повреждения в лимфоцитах и эритроцитах крови человека, индуцированные окислительными агентами [24]. Как показали авторы, этот эффект связан со способностью Кр обезвреживать свободные радикалы, а также предотвращать подавление клеточной ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты, индуцированное окислительным стрессом. Кроме того, методом комет-анализа ими было выявлено протекторное действие Кр при повреждении ДНК лимфоцитов, индуцированном окислительным стрессом, вызванном H_2O_2 . В связи с этим значительный интерес представляют данные о том, что повышение концентрации внутриклеточного Кр защищает митохондриальную ДНК от функционально значимых мутаций, которые ассоциированы со старением [28]. Прием Кр оказывает защитный эффект и на оксидативное повреждение ДНК и перекисное окисление липидов, вызванные возрастающими критическими физическими нагрузками у спортсменов [29].

Что касается антиапоптотического действия Кр, то показано, что Кр совместно с октамерной мит-КК, являющейся регулятором кальциевого гомеостаза, предотвращает или приостанавливает открытие потенциал-зависимых анионных каналов в митохондриальной мембране, через которые и происходит высвобождение апоптотических факторов из митохондрий, как например, цитохрома с и субстратов каспаз, а также Ca^{2+} [30]. В связи с этим интересно отметить, что прием Кр вызывает высокую степень резистентности к фактору некроза опухоли и апоптозу, индуцированному гипоксией в клетках печени трансгенных мышей, экспрессирующих высокие уровни ВВ-КК [31]. И, наоборот, у пациентов с синдромом недостаточности Кр выявляются повышенный окислительный стресс и апоптоз, индуцированные реакционноспособными формами кислорода [32]. Таким образом, дополнительно к широко известной роли Кр-КФ-КК системы в энергетическом обмене энергетически высокочувствительных клеток, Кр обладает также антиапоптотическими, анти-эксайтотоксическими и плейотропными антиоксидантными свойствами как *in vitro*, так и *in vivo*. Взятые вместе перечисленные данные, а также

сведения [33] о том, что Кр способен проникать сквозь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), не вызывая нежелательных эффектов, наглядно демонстрируют нейропротекторный потенциал Кр и поддерживают гипотезу его терапевтического действия при заболеваниях нервной системы и, особенно, при нейродегенеративных заболеваниях. В настоящее время обсуждаются следующие, не исключающие друг друга, механизмы протекторного действия Кр: механизм поддержания энергетического и кальциевого гомеостаза клетки, механизм его антиоксидантного действия, и, наконец, механизм его антиапоптотического действия. Благодаря этим механизмам Кр улучшает сопротивляемость клеток стрессу, делая их менее восприимчивыми к повреждению [15, 16, 33].

Основную часть необходимого Кр (по химическому составу метилгуанидоуксусную кислоту) организм человека получает через пищу из мясных продуктов, а остальное его количество синтезируется в печени, селезенке и почках. Среднестатистическая диета обеспечивает 1 г Кр в день и еще столько же в день синтезируется в организме человека. Сначала из аргинина и глицина под действием скорость-лимитирующего фермента L-аргинин:глицин-амидинотрансферазы синтезируется гуанидиноацетат, который затем в печени метилируется S-аденозил-метионином под воздействием фермента гуанидинацетат-метилтрансферазы с образованием конечного продукта [34]. В сравнении со скелетными мышцами (содержание Кр более 90%) процентное содержание Кр в мозге от общего пула Кр в организме невелико, примерно 5%. В клетке Кр и КФ могут спонтанно и необратимо деградировать в конечный продукт, креатинин, который выводится из организма через почки со скоростью примерно 2 г в день [35]. Через кровь Кр экспортируется в ткани, клетки которых поглощают его с помощью специального Na-зависимого транспортера Кр, который работает против концентрационного градиента Кр [36]. Однако, следует указать на ограниченную проницаемость Кр в мозг, поскольку, хотя и транспортер Кр экспрессируется в эндотелиальных клетках микрокапилляров ГЭБ, но в астроцитах, которые окружают кровеносные сосуды ГЭБ, он отсутствует. В то же время показано, что мозг обладает потенциалом синтезировать эндогенный Кр; при этом в различных клетках по всему мозгу имеет место сложная гетерогенная мозаичная экспрессия изоферментов КК, ферментов синтеза Кр и транспортера Кр. Вследствие этого происходит межклеточный обмен гуанидиноацетата и/или Кр между различными клетками мозга, что еще больше усложняет имеющуюся картину [37]. Таким образом, после прохождения ГЭБ Кр из экстрацеллюлярной жидкости мозга извлекается клетками, которые экспрессируют транспортный белок Кр, как например нейро-

ны и олигодендроциты, а астроциты, лишённые этого белка, синтезируют его сами [35]. В связи с этим следует отметить, что вопросу прохождения Кр через ГЭБ посвящено немало работ, поскольку ряд исследователей именно с этим связывают неоднозначность результатов клинических испытаний по оценке эффективности Кр в качестве адъювантной терапии при некоторых нейродегенеративных заболеваниях [5, 33]. Однако, получены данные, которые окончательно подтвердили, что Кр может проходить через ГЭБ, хотя и с довольно низкой эффективностью, а также тот факт, что мозг способен удовлетворять часть своих потребностей в Кр за счет его собственного эндогенного синтеза. С использованием метода протонной магнитно-резонансной спектроскопии *in vivo* было исследовано накопление Кр в сером и белом веществе мозга, мозжечке и таламусе 6 молодых здоровых добровольцев при приеме *per os* по 5 г креатина-моногидрата 4 раза в день в течение 4 нед. Как результат, отмечалось статистически достоверное усредненное для всего мозга возрастание общей концентрации Кр на 8.7%; при этом была выявлена значительная межсубъектная вариабельность в пределах 3.5–13.3%. Региональное распределение этого показателя также характеризовалось вариабельностью: в сером веществе — 4.7%, белом веществе — 11.5%, в мозжечке — 5.4% и в таламусе — 14.6% [38].

Показано, что эффективность и биодоступность Кр, а также накопление его в скелетных мышцах при приеме его *per os* в присутствии сахаров возрастает. Как известно, углеводы с высоким гликемическим индексом как глюкоза и сахароза вызывают высокую секрецию инсулина, который, как оказалось, обладает стимулирующим действием на Na-зависимый транспортер Кр [39].

Безопасность длительного приема Кр широко исследовалась и большинство данных, обобщенных в работах [40–42], свидетельствует об отсутствии значимых побочных эффектов. Для более подробной информации о роли Кр-КФ-КК системы в метаболизме клетки и различных точках приложения ее протекторного действия можно ознакомиться со следующими классическими [5, 15, 43], а также недавними обзорами [2, 6–8, 33, 44 и др.].

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КР: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Нейродегенеративные заболевания

Терапевтическое действие Кр наиболее изучено при различных нейромышечных заболеваниях, данные о которых досконально проанализированы в ряде критических обзоров с использованием

методов доказательной медицины и, в частности, в обзоре Б. Гуалано и соавт. [45]. Убедительно показана эффективность Кр как пищевой добавки при врожденной недостаточности синтеза ферментов, участвующих в эндогенном синтезе Кр, а именно L-аргинин:глицин амидинтрансферазы и гуанидинацетат-метилтрансферазы и отсутствие положительного эффекта Кр при дефиците транспортера Кр [2, 15]. Как было отмечено выше, в последние два десятилетия были опубликованы многочисленные работы по использованию Кр в качестве нейропротектора на моделях животных, имитирующих БХ, БА, БП и БАС (боковой амиотрофический склероз) в результате которых были получены обнадеживающие позитивные данные. Это послужило основанием для перехода к соответствующим клиническим исследованиям, результаты которых оказались, к сожалению, неоднозначными. Ниже вкратце представлены доступные на сегодняшний день соответствующие данные по отдельным заболеваниям.

Болезнь Паркинсона. БП это нейродегенеративное заболевание, вызываемое потерей дофаминовых рецепторов в среднем мозге и характеризуемое формированием в мозге телец Леви. Симптомы болезни, а именно, тремор в состоянии покоя, постуральная неустойчивость, гипокинезия, потеря мышечной массы, ригидность, повышенная утомляемость и др., проявляются лишь при потере примерно 60% дофаминовых нейронов [46]. На молекулярно-клеточном уровне при этом заболевании отмечается митохондриальная дисфункция, связанная с недостаточной эффективностью электронной транспортной цепи, и окислительный стресс [47, 48]. Во многих исследованиях по паркинсонизму потерю тирозингидроксилаза-позитивных нейронов, содержащих фермент, который является скоростью-лимитирующим в синтезе L-дигидроксифенилаланина, предшественника дофамина и норепринефрина, а также уровень содержания белка α -синуклеина, основного компонента телец Леви, используют в качестве биомаркеров заболевания. Лечение предусматривает раннее диагностирование болезни и определение мер, замедляющих ее прогрессирование.

Преคลินิกские исследования на мышах, на которых была разработана общепринятая на сегодняшний день модель БП с использованием нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина, показали пользу пищевой добавки Кр, как нейропротектора. В первую очередь следует отметить работу Р. Мэтьюса и соавт., которые, используя метод иммуноокрашивания тирозингидроксилазы, показали, что прием *per os* Кр значительно снижает уровень потери дофаминергических нейронов. Кроме того, согласно их данным между группой мышей с индуцированной БП, получавшими Кр, и контрольной группой интактных мышей в черной субстанции головно-

го мозга (*Substantia nigra*) не было выявлено различий в количестве подсчитанных нейронов, что свидетельствовало о нейропротекторном действии Кр [49]. В исследовании на модели крыс с БП, получавших в качестве терапии дополнительно к Кр коэнзим Q10, было показано уменьшение объема поражения и снижение уровня α -синуклеина в мозге, а также снижение потери тирозингидроксилаза-позитивных нейронов при сравнении с больными крысами, не получавшими лечение [50]. Эффективность Кр была показана и *in vitro* в различных тест-системах [51, 52]. Таким образом, исходя из результатов исследований на животных и культурах клеток с середины 2000-х гг., был предпринят ряд клинических испытаний по изучению Кр, как терапевтического средства при БП, которые большей частью свидетельствовали об эффективности Кр [53–56].

После завершения в 2006 г. второй фазы клинических исследований о пользе Кр на ранних стадиях БП, предварительные результаты которой показали способность Кр замедлять прогрессирование заболевания [56], исследователи из Национального института неврологических расстройств и инсульта в США начали 3-ю фазу испытаний Кр на 1741 больных из разных регионов Северной Америки. Тестируемая группа, получавшая Кр в дозе 20 г в день в течение 5 дней с последующим приемом 5 г Кр в день в течение 5 лет, сравнивалась с контрольной группой, не получавшей Кр: при этом обе группы выполняли упражнения сопротивления [57]. Однако, в 2013 г. Национальный институт неврологических расстройств и инсульта объявил, что третья фаза клинического испытания по использованию Кр при БП была приостановлена по причине отсутствия статистически значимых различий клинических результатов при сравнении групп получавших Кр и плацебо достаточно длительное время [58]. При этом было отмечено отсутствие проблем с безопасностью приема Кр на протяжении 5 лет по 5 г дважды в день. В заключении обновленного в 2017 г. мета-анализа по оценке терапевтической эффективности Кр при БП, проведенного на основании пяти, отобранных по соответствующим критериям плацебо контролируемых рандомизированных исследований, включающих 1339 участников, отмечено, что Кр не обладает эффективностью в лечении пациентов с БП, хотя требуются дополнительные данные для определения, способен ли Кр улучшить повседневную бытовую активность пациентов [13]. Однако, несмотря на эти разочаровывающие результаты, большинство исследователей считают, что необходимы дальнейшие клинические исследования с усовершенствованием протоколов испытаний и, особенно режима приема Кр, учитывая то, что используемые до сих пор дозы (5–20 г Кр в сутки) были значительно ниже тех, которые применялись в положитель-

ных экспериментах с животными [2, 6–8, 59]. Так например, значительный оптимизм о пользе Кр-добавки для больных паркинсонизмом высказывают в своем недавнем обзоре, посвященном совместному использованию Кр и физических упражнений в качестве терапевтического средства С. Грэхем и сотр., которые также считают, что для реализации полного потенциала этой пищевой добавки необходимо более глубокое понимание оптимального применения его [60].

Болезнь Хантингтона. БХ — нейродегенеративное заболевание, симптомы которого, а именно нарушения в координации движений, настроения, когнитивных способностей, тремор и даже эпилептические припадки, проявляются в среднем возрасте и после их проявления продолжительность жизни прогнозируется примерно еще на 20 лет [61]. Болезнь определяется наследуемой мутацией в гене, кодирующем белок гентинтин, который экспрессируется в центральной и периферической нервной системах и других тканях [62]. На молекулярно-клеточном уровне продукция мутантного белка ведет к нарушению энергетического обмена. При этом имеет место уменьшение соотношения КФ к Φ_n в мышечной ткани, что указывает на вовлечение этой мутации в дисрегуляцию соотношения КФ к Кр [63].

В преклинических исследованиях на моделях БХ, индуцированной у мышей токсинами, а также на трансгенных мышах было показано, что нарушение энергетического метаболизма включает дисфункцию митохондриальных ферментов, ответственных за транспорт электронов, а также обнаруживается избыточная эксайтотоксичность, ассоциированная с данной болезнью [5, 47, 49, 64–66]. Кроме того, было выявлено снижение активности ВВ-изофермента КК как в мозге, так и в сыворотке крови трансгенных мышей, а также пациентов как на ранних стадиях заболевания, так и на ее манифестной стадии, что послужило основанием предложить КК в качестве биомаркера БХ [67]. Использование Кр в качестве пищевой добавки с использованием этих же моделей болезни показало, что Кр задерживает начало заболевания и замедляет развитие поведенческих и патологических проявлений заболевания, предотвращает церебральный дефицит АТФ, а также увеличивает продолжительность жизни дозозависимым способом [9, 64, 67–69].

Учитывая перечисленные многообещающие экспериментальные данные, были проведены первые клинические испытания. Так например, в плацебо-контролируемом пилотном испытании, в котором пациентам с БХ давали Кр в дозе 5 г в день или плацебо в течение одного года и в течение 6 и 12 месяцев оценивали мышечные и когнитивные функции, никаких различий между этими группами не было обнаружено [70]. В то же время

рандомизированное контролируемое исследование с вовлечением больных с ранней стадией заболевания, которые получали Кр в дозе 8 г в день, показало, что Кр снижает повышенное содержание в плазме больных 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина, маркера оксидативных ДНК-повреждений [71]. Позднее этими же авторами была проведена вторая фаза клинических испытаний с пациентами, имеющими высокий риск развития БХ, которые получали более высокие дозы Кр (35 г в день) с тем, чтобы оценить как эффективность Кр, так и его безопасность [72]. Оценка степени атрофии мозга спустя 6 и 18 мес. приема Кр и плацебо показала, что в случае продромальных пациентов Кр значительно замедлял региональную атрофию мозга, а также был безопасен при использовании в высоких дозах. Вместе взятые эти данные предполагали, что Кр может быть эффективным при лечении БХ до развития его клинических симптомов. Однако, недавно опубликованные результаты третьей фазы клинических испытаний (CREST-E) с вовлечением больных с ранними проявлениями симптомов БХ, с тем чтобы оценить безопасность высоких доз Кр, до 40 г в день в течение 5 лет, и их эффекты на замедление прогрессирования этих симптомов, принесли неожиданное разочарование [9]. При этом следует отметить, что CREST-E на сегодня представляет собой наибольшее по числу участников и их демографической представительности, наиболее длительное по продолжительности и наиболее высокое по используемой дозе клиническое исследование Кр при нейродегенеративных заболеваниях. Согласно заключению авторов, несмотря на то, что данное исследование было хорошо оснащено с тем, чтобы обнаружить клинически значимые положительные эффекты Кр, оно не смогло продемонстрировать такое действие Кр на клинические результаты [9]. Однако, анализ данных по половому признаку выявил положительную тенденцию среди мужчин и отрицательный эффект среди женщин. Здесь необходимо отметить, что гендерные различия не были отмечены в предыдущих клинических испытаниях по БХ, но были описаны в отношении эргогонического действия Кр и его влияния на мышечную массу [73]. Таким образом, терапевтический потенциал Кр для лечения БХ остается все еще предметом исследований.

Болезнь Альцгеймера. БА — основная причина деменции у людей среднего и пожилого возраста. Одной из особенностей БА является то, что точный диагноз болезни можно поставить только при патологоанатомическом исследовании. По мере прогрессирования болезни симптомы болезни включают тяжелую деменцию, спутанность сознания и потерю долговременной памяти. Болезнь характеризуется потерей нейронов в коре головного мозга и определенных подкорковых областях, которая связана с отложениями внекле-

точных бляшек (пептид-амилоид- β и клеточный материал) вокруг нейронов, а также с отложениями внутриклеточных нейрофибриллярных клубков (агрегация связанного с микротрубочками белка Тау в гиперфосфорилированной форме). Показано, что эти повреждения связаны с мутациями в белке-предшественнике амилоида [74]. Одним из наиболее ранних обнаруживаемых дефектов у пациентов с БА является нарушение энергетического метаболизма и дисфункция митохондриальной цепи транспорта электронов [75]. Другой биохимической характеристикой пациентов с БА является более высокий уровень окислительного повреждения митохондриальной ДНК, липидов и белков по сравнению с контрольными испытуемыми [76]. На молекулярном уровне у этих пациентов выявлена также инактивация изоферментов КК головного мозга, вызванная их окислением, а также появление отложений, богатых Кр, что может усугубить энергетическое состояние нейронов и обострить нейродегенеративный процесс [77]. Возможные механизмы образования отложений Кр подробно обсуждаются в следующих обзорах [5, 78]. Полагают, что Кр в качестве адъювантной терапии может быть применен без относительного риска только на ранних стадиях БА, поскольку инактивация изоферментов КК мозга и отложение Кр в нейронах, являются процессами, связанными между собой. Возможно именно с этим риском связано отсутствие на сегодняшний день каких-либо данных клинических испытаний с вовлечением пациентов с БА.

Есть основание считать, что при БА Кр может оказывать нейропротекторное действие за счет снижения агрегации белков, поскольку в экспериментах по седиментации было продемонстрировано, что Кр может вмишиваться в агрегацию белков, катализируемую трансклутаминазой [79]. Кроме того, как указывалось выше, Кр является эффективным нейропротектором при нейротоксичности, вызванной амилоидом- β в клеточной культуре нейронов гиппокампа [26]. С другой стороны, поскольку воспаление относится к ведущим факторам патогенеза БА, эффекты, наблюдаемые в клетках, могут быть, по крайней мере частично, обусловлены и противовоспалительными свойствами [80]. Однако, следует отметить недавнюю работу М. Али Мохаммади и его коллег [81], которые показали, что Кр в качестве пищевой добавки не влиял на обучение, восстановление памяти или апоптоз нейронов крыс, которым с целью получения экспериментальной модели БА вводили β -амилоид.

Боковой амиотрофический склероз. БАС прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, при котором поражаются моторные нервные клетки в коре головного мозга и спинном мозге, что ведет к повсеместному параличу и укороче-

нию жизни. На молекулярном уровне в патомеханизмы БАС вовлечены митохондриальная дисфункция, цитоскелетные нарушения, глутаматная эксайтотоксичность и окислительный стресс, что дает основание предполагать нейропротекторное воздействие на нее Кр [82]. Примерно в 10% случаев это заболевание наследственное и вызывается генными мутациями, среди которых основной является мутация гена медь/цинк зависимой супероксиддисмутазы (СОД1), которая ответственна за снижение содержания свободных радикалов в клетке [83]. К сожалению, для БАС, также, как и для БХ и БП, нет действенного лекарства для остановки прогрессирования заболевания. Трансгенные мыши, несущие 23 копии человеческого гена СОД1G93A, стали стандартной моделью БАС, которая воспроизводит патологию, связанную с этой болезнью [84]. Однако, данная модель представляет лишь наследственную форму БАС, тогда как для спорадической формы болезни, которой болеют 90% пациентов, причины до сих пор не выявлены. В двух преклинических испытаниях Кр с использованием этой модели, проведенных одной и той же группой исследователей, были получены обнадеживающие данные о нейропротекторном действии Кр, а именно дозозависимое увеличение продолжительности жизни при приеме 1 и 2% Кр в диете, уменьшение гибели нейрональных клеток и замедление в развитии моторных нарушений [20, 85]. В противоположность этим положительным данным клинические испытания по оценке терапевтического действия Кр при БАС имели отрицательный результат: Кр не оказывал никакого действия ни на выживаемость, ни на моторную и дыхательную функции пациентов [86–88]. Такой результат может быть связан с тем, что пациенты, вовлеченные в эти испытания, не были специально отобраны по мутации ассоциированной с медь/цинк зависимой супероксиддисмутазой и не соответствовали изученной модели. Кроме того, как и в случае описанных выше нейродегенеративных заболеваний, дозы Кр в этих испытаниях были значительно ниже, чем в опытах на животных.

В заключение этого подраздела считаем нужным привести результаты критического анализа данных ряда больших клинических испытаний по оценке эффектов Кр как пищевой добавки при БП и БХ, а также БАС, проведенного А. Бендером и Т. Клопстоком обзоре под красноречивым названием “Creatine for neuroprotection in neurodegenerative disease: end of story?” (“Креатин в качестве нейропротектора при нейродегенеративных заболеваниях: конец истории?”) [59]. В работе проанализированы данные обследования в общей сложности 1687 пациентов, принимавших в среднем 9.5 г Кр в день, что составляет в общей сложности 5480 пациенто-лет. Результаты не выявили клинической пользы Кр для пациентов с

БП или БАС, а для пациентов с БХ были обнаружены некоторые доказательства того, что прием Кр замедлял прогрессирование атрофии головного мозга, хотя клинические маркеры при этом не были затронуты. Как считают авторы, еще предстоит определить, может ли Кр в виде пищевой добавки иметь положительное действие на другие клинические маркеры в этих группах пациентов и/или могут ли отдельные пациенты реагировать на добавление Кр более положительно, чем другие, т.е. имеются ли при этом индивидуальные различия. Кроме того, как отмечают Е. Долан и соавт. [89] при проведении клинических испытаний наряду с величинами применяемых доз Кр необходимо учитывать продолжительность их приема, стадию заболевания, возможные гендерные различия, корректность выбора и оценки клинических симптомов, а также адекватность используемых методов статистической обработки.

Травматические повреждения мозга

Травматические повреждения мозга в результате несчастных случаев в быту и спорте часто приводят к когнитивным нарушениям у пациентов. Если первичные нарушения являются результатом повреждения ткани в момент травмы, то вторичные связаны с нарушением гомеостаза кальция, ведущего к митохондриальной дисфункции и недостаточности снабжения нейронов АТФ [90–92]. П. Салливан и соавт. [93], используя модель болезни на мышах и крысах, показали способность Кр в качестве пищевой добавки уменьшать степень повреждения ткани при интраперитонеальном введении Кр как до, так и после травмы в кратковременном или долгосрочном режиме. В пилотных клинических исследованиях краткосрочных [94] и долгосрочных эффектов [95] Кр в качестве пищевой добавки при травматических повреждениях мозга у детей и подростков было обнаружено следующее: пациенты, получавшие *per os* Кр в дозе 0.4 г на кг массы в течение 6 мес. после травмы показали значительное улучшение когнитивных функций, общения, самообслуживания, личностных качеств и поведенческих реакций. Спустя 6 мес. после травмы у этих пациентов наблюдалось снижение проявления таких симптомов как головокружение, головные боли и утомляемость. Следует отметить, что, как считает большинство исследователей, на сегодняшний день эти данные о потенциальной пользе Кр для пациентов с травматическими повреждениями мозга являются весьма многообещающими и требуют дальнейших широкомасштабных клинических испытаний [89]. Вместе с тем они оказались недостаточными для того, чтобы Международное общество спортивного питания рекомендовало прием Кр для уменьшения тяжести травм спортсменов, которые, занимаясь спортом, сталкиваются

ся с риском черепно-мозговых и/или спинномозговых травм.

Инсульт. Церебральная ишемия

Во всем мире инсульт является одной из ведущих причин смертности людей и значимой причиной инвалидности. Нейропротекторное действие Кр при инсульте на соответствующей модели мышей исследовано С. Жу и сотр. [96]. Авторы, перед 2-часовой окклюзией средней мозговой артерии, в течение 4 нед. вскармливали животных Кр в количестве 2% от рациона. У мышей, получавших Кр, было выявлено существенное уменьшение объема поражения мозговой ткани и неврологических нарушений в сравнении с контролем при наличии прямой корреляции с сохранностью энергетического статуса клетки и ингибированием активации каспазных механизмов гибели клетки. В недавнем исследовании нейропротекторной эффективности Кр при гипоксически-ишемической энцефалопатии новорожденных мышей, вызванной перевязкой сонной артерии в течение 25 мин, было показано, что в группе мышей с обогащенной Кр диетой (1–3%) в течение 3 нед. наблюдалось достоверное улучшение показателей обучаемости и памяти и уменьшение объемов поражения мозга [97]. При том что в доступной нам литературе, к сожалению, не обнаружено сведений о соответствующих клинических исследованиях, описанные выше экспериментальные данные дают основание полагать о пользе применения Кр, как дополнительного ресурса при лечении больных с инсультом и церебральной ишемией.

Психические заболевания

Ухудшение энергетического метаболизма мозга и изменения в нейрональной пластичности принято считать одними из основных патогенетических причин психических заболеваний [98]. Так например, у мышей хронический легкий стресс (животная модель депрессии) вызывал в гиппокампе и префронтальной коре мозга животных функциональные нарушения митохондрий и повреждения их ультраструктуры и, при этом повышал их депрессивно-подобное поведение [99]. В последние годы благодаря достижениям технологий нейровизуализации значительно улучшилась возможность исследования связи биоэнергетики мозга и, в частности метаболизма Кр, с психическими заболеваниями.

Роль дисфункции метаболизма Кр при депрессии впервые была рассмотрена в середине 80-х гг. [100]. Авторы обнаружили значимую отрицательную корреляцию между уровнями креатинина в спинномозговой жидкости и суицидальными мыслями пациентов. Кроме того, ими была выявлена положительная связь между метаболитами дофа-

мина и уровнями Кр и креатинина в спинномозговой жидкости пациентов, страдающих депрессией. Позже оценка симптомов, характеризующих сложность заболевания, и нейровизуальных данных подтвердили связь между метаболизмом Кр в мозге и депрессией. Оказалось, что активность КК в сыворотке крови [101], уровни Кр белого вещества [102], общего Кр дорзолатеральной префронтальной коры [103] и КФ лобной доли [104] коррелировали с уровнем сложности депрессии: по-видимому, пониженный метаболизм Кр связан с менее благоприятным течением заболевания и его конечного результата.

Тем временем в литературе накапливались работы, рекомендующие использование моногидрата Кр для предотвращения и лечения депрессии. Так, например, данные, полученные в преклинических исследованиях на самках крыс, показывают, что прием Кр в качестве пищевой добавки в дозе 4% от ежедневного рациона в течение 5 нед. вызывал у животных антидепрессант-подобные эффекты, которые оценивались с использованием теста по принудительному плаванию [105]. В испытаниях на пациентах с депрессией показано улучшение настроения взрослых больных с медикаментозной резистентностью после приема Кр в дозе 3–5 г в день в течение 4 нед. [106, 107]. В другом аналогичном по дизайну клиническом исследовании, но уже с девочками-подростками, принимающими селективный ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетина, дополнительный ежедневный прием 4 г Кр в течение 8 нед. уменьшал симптомы депрессии и увеличивал концентрацию КФ в мозге [108]. Наконец, необходимо отметить ряд исследований, в которых было показано, что агенты с заявленной антидепрессивной активностью могут повышать уровень креатинсодержащих соединений в мозге. Так, прием ацетил-L-карнитина, который обладает антидепрессантным эффектом, вызывал у гериатрических пациентов с депрессией повышение уровня КФ в мозге, которое коррелировало с показателями шкалы оценки депрессии Гамильтона [109]. С другой стороны, А. Сарториус и сотр. [110] используя технологию магнитно-резонансной спектроскопии для изучения метаболических изменений в гиппокампе крыс с “выученной беспомощностью” (хорошо зарекомендовавшая себя модель депрессии), продемонстрировали значительное повышение уровня Кр, вызванное лечением их электросудорожным шоком.

Биполярные расстройства (БР) характеризуются чередованием эпизодов мании и депрессии, хотя у большинства больных преобладает одно из этих состояний. Точная причина заболевания неизвестна, но наследственность играет важную роль в его патогенезе. Также имеются данные о нарушениях регуляции обмена серотонина, норадреналина и дофамина [111]. С накоплением

данных о митохондриальной дисфункции мозга у больных БР возник значительный интерес к выяснению роли Кр-КФ-КК системы в патогенезе этого заболевания. Так, например, анализы *post mortem* выявили значительное снижение уровней мРНК ВВ-КК и мит-КК в дорсолатеральной префронтальной коре и гиппокампе пациентов с БР в сравнении с больными шизофренией и здоровыми людьми [112]. Кроме того, имеется ряд работ, сообщающих о повышенных уровнях сывороточной КК у больных в маниакальном состоянии в сравнении с таковыми в эутимическом и депрессивном состояниях, что может указывать на то, что изменения активности КК соответствуют проявлению настроения и скорости мышления биполярных пациентов [113, 114]. В ряде работ с использованием нейровизуализационных методов в различных отделах лобной доли больных было найдено выраженное в различной степени понижение уровней КФ или общего Кр [115, 116]. Однако, как отмечает в своем обзоре П. Аллен [117], есть работы, в которых в этих же отделах мозга больных БР с использованием аналогичных методов нейровизуализации не были найдены различия в метаболизме Кр этих больных и здоровых добровольцев.

На сегодняшний день отсутствуют прямые данные, подтверждающие пользу Кр, как пищевой добавки для биполярных пациентов, если не считать небольшой предварительной работы С. Ройтмана и соавт. [107], на основании которой он пришел к выводу, что моногидрат Кр имел положительный эффект в случае униполярной депрессии, представленной группой из 7 пациентов, тогда как в случае 2 биполярных пациентов мог спровоцировать маниакальные эпизоды.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о возможном участии нарушений энергетического метаболизма клеток головного мозга в патофизиологии и **посттравматического стрессового расстройства** (ПТСР). Так, например, у пациентов с диагнозом ПТСР при сравнении со здоровыми испытуемыми было обнаружено снижение уровня общего Кр как в правой, так и левой областях гиппокампа [118]. Изучение конкретного случая с женщиной 52-х лет, страдающей ПТСР, депрессией и фибромиалгией, показало, что прием Кр оказывал лечебный эффект [119]. Эта пациентка до приема Кр была резистентна к психотропным медикаментам и имела аномально низкие уровни мышечных КФ и АТФ. После ежедневного приема Кр отмечалось улучшение симптоматики депрессии и фибромиалгии и существенно повысилось качество жизни пациента.

У больных, страдающих **шизофренией**, в лобной и височной долях, гиппокампе и базальных ганглиях отмечаются нарушения в метаболизме, целостности клеточных мембран, а также числен-

ной плотности нейронов [120, 121]. Обнаружены специфические отклонения в Кр-КФ-КК-системе эмоциональной и исполнительной областей мозга больных шизофренией. Так например, при 31Р магнитно-резонансной спектроскопической визуализации *in vivo* пациентов с хронической шизофренией и контрольной группы была выявлена следующая асимметрия в височных долях: в правой доле КФ и отношения КФ/АТФ, КФ/Ф_н были значительно выше, а АТФ ниже, чем в левой доле, в то время как в контрольной группе асимметрии фосфорсодержащих метаболитов выявлено не было. Кроме того, оказалось, что как сравнительно низкий уровень левого височного КФ, так и степень асимметрии височной доли КФ существенно коррелировали с краткой психиатрической рейтинговой шкалой, что свидетельствует о возможной связи этой асимметрии с клиническими симптомами [122]. В другом исследовании было показано, что шизофреники с выраженными отрицательными симптоматическими показателями имели более высокие уровни КФ в левой лобной доле, чем больные с незначительными негативными симптомами и здоровые контрольные испытуемые [123]. В дополнение к перечисленному в теменных долях больных была обнаружена асимметрия по соотношениям КФ/АТФ и КФ/Ф_н, которая также была связана с уровнем тяжести психиатрических симптомов [124]. Что касается здоровых подростков с высоким риском развития шизофрении, определенного на основании наличия близкого родственника, болеющего шизофренией, то у них выявлялось существенное снижение уровня общего Кр в хвостатом ядре при сравнении с контролем [125]. С другой стороны, в исследовании пар близнецов, дискордантных по шизофрении, пораженные болезнью близнецы имели более высокий уровень гиппокампального Кр, чем их здоровые пары, что, как считают авторы, предполагает возможность использования Кр в качестве маркера риска поражения шизофренией [126]. Интересно отметить, что отмеченное выше снижение уровней Кр и/или КФ у больных шизофренией соответствует обнаруженной ранее сверхвысокой активности сывороточной КК у этих больных в состоянии острого психоза. Было показано, что примерно у половины больных подростков в этом состоянии в сыворотке крови резко повышается уровень активности мышечного изофермента КК, тогда как у пациентов, испытывающих хронические эпизоды психоза, наблюдается нормальный уровень активности КК. При этом указанное повышение активности КК имеет гендерные различия, будучи более выраженным у мужчин, чем у женщин [127]. Для исследования терапевтического потенциала Кр на нарушения энергетического метаболизма мозга при шизофрении, в частности, его гипоактивных структур, включая фронтальные области, было проведено

небольшое по численности пациентов рандомизированное двойное слепое перекрестное клиническое испытание (дозировка Кр 3–5 г в день в течение 3 мес.). Оказалось, что эффект Кр не превосходил плацебо в лечении симптомов шизофрении [128]. В связи с этим следует отметить, что неоднородность шизофрении, как по нейропсихологическим симптомам, так и по лечебным эффектам, с одной стороны, и характер и продолжительность заболевания, с другой стороны, а также трудности с оценкой улучшения симптомов, могли повлиять на результаты этого небольшого исследования [129].

Когнитивные способности здоровых людей

Экспрессия изоферментов КК в гиппокампе и лобной коре свидетельствует о том, что метаболизм Кр играет важную роль в осуществлении высшей нервной деятельности [117]. Еще в 2003 г. Ц. Реи и сопр. [130] задались вопросом, способствует ли дополнительный прием Кр повышению умственных способностей. В двойном слепом контролируемом плацебо исследовании испытуемые, 45 молодых людей, среди которых была и группа вегетарианцев, в течение 6 недель получали *per os* Кр в дозе 5 г в день. В результате, на основании соответствующих тестов, требующих скорости обработки, авторы пришли к заключению, что использованный протокол приводил к значимому улучшению рабочей памяти и умственных способностей испытуемых. При этом у каждого участника-вегетарианца экзогенный Кр вызвал повышение уровня сывороточного Кр. Кроме того, используя метод магнитно-резонансной спектроскопии, авторы обнаружили повышение уровня Кр в мозге исследуемых лиц, что свидетельствовало о том, что Кр проникал в мозг. О повышении уровня Кр в мозге испытуемых после приема Кр по схеме 0.3 г/кг массы в день в течение первых 7 дней и 0.03 г/кг массы в день в течение следующих 7 дней свидетельствовали и данные, полученные Кюн и соавт. [131] с использованием опять же магнитно-резонансной спектроскопии высокоэнергетических фосфатных метаболитов. Представляет интерес, что обогащение рациона Кр улучшает когнитивную деятельность как молодых [132], так и пожилых людей [133]. Кроме того, как показали эти же авторы Кр-добавка уменьшает ментальную усталость, индуцированную такими стрессорными факторами, как математические расчеты [132] и лишение сна, которое снижает содержание Кр в мозге [134]. Что касается последней работы, то результаты ее свидетельствуют также о том, что Кр в качестве пищевой добавки ограничивает негативные эффекты 24-часового лишения сна на когнитивные и психомоторные функции и состояние настроения, тогда как при более коротких периодах недосыпания положительный

эффект Кр на указанные функции не обнаруживается. Интересно отметить, что Кр в качестве пищевой добавки вызывает большее улучшение памяти у вегетарианцев, чем у людей, употребляющих мясо [135]. Анализируя приведенные выше данные, Е. Долан [89] приходит к выводу, что при рассмотрении вопроса об эффективности действия Кр на когнитивные функции надо учитывать то, что Кр лучше проявляет свое положительное действие в ситуациях, когда эти функции испытывают стресс, как например, лишение сна, экспериментальная гипоксия или решение сложных задач, требующих напряжения умственных сил. Так например, было проведено исследование по оценке влияния перорального приема моногидрата креатина на нейрофизиологическую и нейропсихологическую функцию здоровых молодых людей во время острой кислородной недостаточности. Пятнадцать здоровых взрослых получали Кр и плацебо в течение 7 дней, что повысило содержание Кр в мозге в среднем на 9.2%. Оказалось, что прием Кр увеличивает кортикомоторную возбудимость и предотвращает снижение внимания, которое происходит во время тяжелого кислородного дефицита, что подтверждает нейропротекторное действие Кр при нарушении энергоснабжения клеток мозга [136].

Поскольку усвоение Кр мозгом является медленным и ограниченным, исследователи сегодня изучают возможность замены Кр его предшественниками, например, гуанидинацетатом, что будет способствовать большему накоплению Кр в мозге. Одно из недавних исследований показало, что добавка гуанидинацетата (3 г в день) увеличивает содержание Кр в мозге в большей степени, чем моногидрат креатина [137]. Другие вопросы, которые стоят на повестке дня, это изучение возможной пользы приема Кр для когнитивных функций у детей, а также у пациентов с деменцией и, наконец, детальное изучение молекулярно-клеточных механизмов протекторного действия Кр.

В завершение этой главы предлагаем вашему вниманию схему, представляющую предполагаемую степень эффективности терапевтического и профилактического использования Кр при различных заболеваниях и состояниях организма, построенную на основании представленного в обзоре экспериментального и клинического материала (рис. 2).

ПРОТЕКТОРНЫЕ РЕСУРСЫ КРЕАТИНА И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Сегодня очевидно, что Кр содействует широкому спектру физиологических реакций, причем вклад его в их осуществление выходит за рамки удовлетворения только энергетических потребностей клетки. Так, например, Р. Крейдер и соавт. перечисляют следующие эффекты Кр: снижение уров-



Рис. 2. Относительная эффективность терапевтического и профилактического использования Кр при различных заболеваниях, метаболических нарушениях и состояниях организма. Примечание: АГАТ – L-аргинин: глицин-амидин-трансфераза; ГАМТ – гуанидинацетат-метилтрансфераза.

ней холестерина и триглицеридов, снижение уровня гомоцистеина, антиоксидантное действие. Кроме того, Кр смягчает гипергликемию и улучшает гликемический контроль у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, замедляет рост опухоли при некоторых онкологических заболеваниях, увеличивает силу и массу мышц; минимизирует потерю костной массы; улучшает функциональные возможности пациентов с остеоартритом и фибромиалгией, позитивно влияет на когнитивную функцию и в ряде случаев служит антидепрессантом [2].

В плане перспективы особый интерес вызывают новые точки приложения протекторного действия Кр. Так, П. Сестили и соавт. убедительно показали, что Кр ускоряет процессы дифференциации миобластов в миотубы, способствует электрофизиологическому созреванию нейробластов [138]. В связи с этим обогащение рациона матери Кр способствует морфофункциональному развитию нейрона гиппокампа у потомства крыс *in vivo*, что дает основание рекомендовать Кр-добавку во время беременности для поддержания развития, созревания мозга и защиты эмбрионального и неонатального мозга от клеточных стрессоров [139].

Основанием для приема Кр в качестве биологической добавки в течение беременности служит то, что плод использует материнский Кр, поступающий через плаценту, вплоть до поздних сроков беременности, и при этом с развитием беременности имеют место существенные изменения в синтезе Кр и его экскреции [2, 15]. В связи с последним, следует отметить, что еще в 1990-х гг. нами было выявлено наличие КК в плаценте в виде ВВ-изофермента, активность которого возрастала с развитием плаценты и плода и достигала максимума перед родами [140, 141]. Таким образом, можно предположить, что в течение беременности имеется повышенная потребность в Кр и его утилизации. Обогащение материнской диеты Кр, как показано в ряде работ на животных, обогащенных в обзорах Т. Валлиманна, улучшает критерии выживания новорожденных и функционирование их органов после асфиксии при родах [15, 33]. В этом аспекте представляют интерес данные, полученные в Санкт-Петербургском НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, о возможности использования изменений уровня активности ВВ-КК амниотической жидкости и

сыворотки крови новорожденных относительно их контрольных значений в качестве показателя тяжести гипоксических повреждений мозга плода в ходе беременности, отягощенной гемолитической болезнью плода, а также хронической плацентарной недостаточностью и такой патологией, как сахарный диабет матери и задержка внутриутробного развития плода [142, 143]. В завершение этой темы, считаем нужным привести особое предупреждение одного из ведущих исследователей Кр-КФ-КК системы Т. Валлиманна, направленное женщинам, которые придерживаются вегано/вегетарианской диеты, с тем чтобы они включали в свою диету свежее мясо и рыбу в течение беременности или обогащали свою пищу высококачественным чистым Кр, для того, чтобы поддержать здоровое эмбриональное и неонатальное развитие потомства [15, 33].

Недавно был выявлен отдельный микрокомпаратмент ВВ-КК, который связан с митотическом веретеном, которому необходимы высокие уровни энергии для инициирования и продолжения клеточного деления. Поскольку ВВ-КК играет важную роль в энергетике деления клеток и контроле клеточного цикла, можно предположить ее участие в прогрессировании раковых клеток и метастазировании [33]. Значительный клинический интерес вызывает многообещающий терапевтический эффект Кр, направленный на понижение цитотоксичности и нефротоксичности, индуцированной антираковым агентом цисплатином, используемым при ренальной дисфункции [144].

Известно, что биосинтез Кр потребляет 40% метильных групп, продуцируемых в виде S-аденозилметионина; с другой стороны, поглощение Кр и активность КК контролируется АМФ-активируемой протеинкиназой, повсеместным датчиком истощения энергии. Таким образом, сегодня Кр рассматривается как потенциальный сенсор метилирования клеток [145].

Как известно, значительное повышение содержания гомоцистеина в крови (гипергомоцистеинемия) с последующим проникновением его в мозг может стимулировать нейродегенеративные процессы и способствовать развитию различных нервно-психических заболеваний (БА, БП, БХ и др.) [146]. В последнее время экспериментальными исследованиями А.В. Арутюняна и соавт. было установлено, что у потомства при гипергомоцистеинемии матери (пренатальной гипергомоцистеинемии) наступает нейровоспаление, обусловленное дисбалансом про- и противовоспалительных цитокинов, сопровождающееся нарушением процессинга нейротрофических факторов и дегенеративными изменениями в гиппокампе и коре головного мозга и последующим нарушением когнитивных функций [147–149]. Наряду с этим, сравнительно недавно было показано, что

Кр проявляет нейропротекторные и антиоксидантные свойства [16] за счет снижения уровня гомоцистеина [150]. При избыточном содержании гомоцистеина подавляется процесс его реметилирования в метионин при участии метионинаденозилтрансферазы и изменяется внутриклеточное соотношение аденозилметионин/аденозилгомоцистеин, являющееся показателем потенциальной способности клетки к метилированию. Можно полагать, что вследствие этого в условиях возникающего дефицита метильных групп при гипергомоцистеинемии нарушается биосинтез соединений, использующих их в качестве акцептора. В этой связи интересно отметить, что снижать уровень гомоцистеина в крови способен также предшественник Кр гуанидинацетат [151].

Одна из новых областей потенциального применения Кр наметилась в результате накопления данных о его влиянии на иммунную систему, которые обобщены в обзоре Л. Рейсберг и соавт. [8]. Как отмечают авторы, в ряде исследований показано, что Кр обладает иммуномодулирующими свойствами. Так, например, добавление Кр может изменить образование и/или экспрессию молекул, участвующих в распознавании инфекций, таких как толл-подобные рецепторы (TLR). Получены доказательства того, что Кр оказывает влияние на цитокины, возможно, через сигнальный путь NF-κB. Вызванное Кр снижение провоспалительных цитокинов (например, IL-6) и других маркеров воспаления (например, TNF-α, PGE2) по мнению авторов может помочь объяснить некоторые из нейропротекторных эффектов Кр, наблюдаемых у пациентов с заболеваниями, связанными с центральной нервной системой (что, на наш взгляд, имеет непосредственное отношение к гипергомоцистеинемии), а также протекторное действие Кр на воспалительные процессы и/или мышечные повреждения в ответ на интенсивные упражнения. В заключение авторы отмечают, что, несмотря на необходимость дальнейших исследований для понимания противовоспалительных и иммуномодулирующих эффектов Кр, очевидно, что эта пищевая добавка обладает указанными эффектами.

Недавно нами была выявлена еще одна область приложения протекторного потенциала Кр. Расширение контактов человека с источниками ионизирующего излучения в медицине и технике, возможность возникновения аварийных ситуаций при применении ядерных технологий в военных и мирных целях неизбежно ставят перед человечеством вопросы обеспечения радиационной безопасности. Не менее актуальной проблемой в этом контексте является возрастающее искусственное “электромагнитное загрязнение” окружающей среды. Изучение радиопротекторных свойств веществ биологического происхождения приобретает особую актуальность в связи с

такими недостатками синтетических радиопротекторов, как высокая токсичность и ограниченная продолжительность действия [152]. Известно, что радиация вызывает в клетке окислительный стресс, что приводит к радиотоксикозу [153]. Поддержание энергетического статуса клетки и повышение резистентности митохондрий и ядра, одно из основных условий защиты клетки против окислительного стресса. Учитывая ключевую роль Кр-КК системы в поддержании энергетического и Са-гомеостаза клетки, а также в обеспечении структурной и функциональной стабильности митохондрий [15, 16] мы исследовали радиопротекторный потенциал креатина моногидрата в экспериментах на крысах. Оказалось, что пострadiaционные изменения уровня активности КК мозга и печени, индуцированные общим однократным рентгеновским и однократным/дробным радиочастотным излучениями имеют компенсаторно-адаптационный характер и направлены на интенсификацию энергетического обмена в тканях этих органов. Кр в растворе глюкозы в виде пищевой добавки существенно стимулирует тканеспецифические нативные адаптационные возможности КК мозга и печени крыс к действию рентгеновского излучения, повышая таким образом радиорезистентность этих органов [154, 155]. Кр в растворе глюкозы в виде пищевой добавки вызывает существенное снижение индуцированной общим однократным рентгеновским излучением геномной нестабильности гепатоцитов, выражающейся в виде повышения полиплоидизации ядер и увеличения доли анеуплоидных и, особенно, гиподиплоидных гепатоцитов. Кр в растворе глюкозы в виде пищевой добавки оказывает радиопротекторное действие на выживаемость крыс с величиной 67% и увеличенной продолжительностью жизни на 39%; генопротекторный эффект, снижая вдвое уровень пострadiaционных поврежденной ДНК мононуклеарных клеток периферической крови крыс; цитопротекторное действие, нивелируя пострadiaционные изменения популяционного состава периферической крови крыс, подвергнутых облучению в дозе 6.5 Гр = ЛД_{70/30} [154–156]. Таким образом, с учетом гепатопротекторного, генопротекторного, цитопротекторного и энергостимулирующего действия, а также его радиозащитного эффекта на выживаемость крыс, Кр может быть рекомендован в качестве потенциального радиопротектора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из обсуждения представленного выше материала преимущества Кр, как пищевой добавки, не ограничиваются применением его при высокоинтенсивных и реабилитационных физических упражнениях, а могут иметь более широкое применение как среди здоровых людей,

так и различных клинических групп пациентов. Основываясь на доступном сегодня научном материале, можно сделать следующие обобщения. Кр в виде пищевой добавки, особенно дополненный силовым тренингом, может способствовать увеличению силы и сохранению или увеличению мышечной массы. Дополнительный прием Кр может поддерживать когнитивную функцию, особенно у пожилых людей. Несмотря на неоднозначные данные клинических испытаний, имеется уверенность в том, что дальнейшие исследования с усовершенствованными протоколами подтвердят нейропротекторный терапевтический потенциал Кр при нейродегенеративных заболеваниях, хотя уже сегодня можно говорить о пользе Кр при БХ, а также травматических повреждениях мозга. Многообещающими кажутся данные о положительном терапевтическом действии Кр на отдельные психические заболевания, как например, депрессии и ПТСР. Очевидно, что протекторный потенциал Кр не раскрыт полностью и список областей его терапевтического и профилактического применения будет расширен на основании активно ведущихся в настоящее время работ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований, а также исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anderson O. // Running Res. News. 1993. V. 9. № 1. P. 1–5.
2. Kreider R.B., Kalman D.S., Antonio J., Ziegenfuss T.N., Wildman R., Collins R., Candow D.G., Kleiner S.M., Almada A.L., Lopez H.L. // JISSN. 2017. V. 14. P. 1–18.
3. Havenetidis K. // J. R. Army Med. Corps. 2016. V. 162. № 4. P. 242–248.
4. Gualano B., Roschel H., Lancha A.H., Jr., Brightbill S.E., Rawson E.S. // Amino Acids. 2012. V. 43. № 2. P. 519–529.
5. Adhietty P.J., Beal M.F. // Neuromolecular Med. 2008. V. 10. № 4. P. 275–290.
6. Bonilla D.A., Kreider R.B., Stout J.R., Forero D.A., Kerksick C.M., Roberts M.D., Rawson E.S. // Nutrients. 2021. V. 13. № 4. <https://doi.org/10.3390/nu13041238>
7. Roschel H., Gualano B., Ostojic S.M., Rawson E.S. // Nutrients 2021. V. 13. № 2. 586.

8. Riesberg L.A., Weed S.A., McDonald T.L., Eckerson J.M., Drescher K.M. // *Int. Immunopharmacol.* 2016. V. 37. P. 31–42.
9. Hersch S.M., Schifitto G., Oakes D., Bredlau A.L., Meyers C.M., Nahin R., Rosas H.D. // *Neurology.* 2017. V. 89. № 6. P. 594–601.
10. Mo J.J., Liu L.Y., Peng W.B., Rao J., Liu Zh., Cui L.L. // *BMC Neurology.* 2017. V. 17. 105.
11. Нерсесова Л.С., Ашмарин И.П., Лызлова С.Н. // *Бюлл. exper. биологии и медицины.* 1973. Т. 24. № 9. С. 43–47.
12. Фрейдлин И.С., Артеменко А.К., Ашмарин И.П., Лызлова С.Н., Нерсесова Л.С., Петрова Т.А., Южакова Г.А. // *Цитология.* 1975. Т. 17. № 2. С. 181–186.
13. Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пономарева-Степная М.А., Андреева Л.А., Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Рясина Т.В. // *Журн. высшей нервной деятельности.* 1997. Т. 47. № 2. С. 420–430.
14. Lyzlova S.N., Stefanov W.E. *Phosphagen Kinases.* Boston. CRC Press. 1991. 240 p.
15. Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. // *Amino Acids.* 2011. V. 40. № 5. P. 1271–1296.
16. Clarke H., Kim D.-H., Meza C.A., Ormsbee M.J., Hickner R.C. // *Nutrients.* 2020. V. 12. № 9. 2834.
17. Schlattner U., Klaus A., Rios S.R., Guzun R., Kay L., Tokarska-Schlattner M. // *Amino Acids.* 2016. V. 48. № 8. P. 1751–1774.
18. Ames A. // *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000. V. 34. № 1–2. P. 42–68.
19. Stöckler S., Isbrandt D., Hanefeld F., Schmidt B., Figura K. // *Am. J. Human Genet.* 1996. V. 58. № 5. P. 914–922.
20. Van der Knaap M.S., Verhoeven N.M., Maaswinkel-Mooij P., Pouwels P.J., Onkenhout W., Peeters E.A., Stöckler-Ipsiroglu S., Jakobs C. // *Ann. Neurol.* 2000. V. 47. № 4. P. 540–543.
21. Almeida L.S., Salomons G.S., Hogenboom F., Jakobs C., Schoffemeer A.N. // *Synapse.* 2006. V. 60. № 2. P. 118–123.
22. Aksenov M., Aksenova M., Butterfield D.A., Markesbery W.R. // *J. Neurochem.* 2002. V. 74. № 6. P. 2520–2527.
23. Lenz H., Schmidt M., Welge V., Schlattner U., Wallimann T., Elsässer H.P., Wittern K.P., Wenck H., Stäb F., Blatt T. // *J. Invest. Dermatol.* 2005. V. 124. № 2. P. 443–452.
24. Qasim N., Mahmood R. // *PLoS one.* 2015. V. 10. № 11. e0141975.
25. Sestili P., Martinelli C., Bravi G., Piccoli G., Curci R., Battistelli M., Falcieri E., Agostini D., Gioacchini A.M., Stocchi V. // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40. № 5. P. 837–849.
26. Brewer G.J., Wallimann T.W. // *J. Neurochem.* 2000. V. 74. № 5. P. 1968–1978.
27. Lawler J.M., Barnes W.S., Wu G., Song W., Demaree S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 290. № 1. P. 47–52.
28. Guidi C., Potenza L., Sestili P., Martinelli C., Guescini M., Stocchi L., Zeppa S., Polidori E., Annibali G., Stocchi V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1780. № 1. P. 16–26.
29. Mirzaei B., F. Rahmani Z., Salehi R., Rahimi R. // *Kinesiol.* 2013. V. 45. № 1. P. 30–40.
30. Schlattner U., Tokarska-Schlattner M., Wallimann T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1762. № 2. P. 164–80.
31. Miller K., Halow J., Koretsky A.P. // *Am. J. Physiol.* 1993. V. 265. № 6. Pt 1. P. 1544–1551.
32. Alcaide P., Merinero B., Ruiz-Sala P., Richard E., Navarrete R., Arias A., Ribes A., Artuch R., Campistol J., Ugarte M., Rodríguez-Pombo P. // *Hum. Mutat.* 2011. V. 32. № 3. P. 282–291.
33. Wallimann Th., Harris R. // *Amino Acids.* 2016. V. 48. № 8. P. 1739–1750.
34. Juhn M.S., Tarnopolsky M. // *Clin. J. Sport Med.* 1998. V. 8. № 4. P. 286–297.
35. Andres R.H., Ducray A.D., Schlattner U., Wallimann Th., Widmer H.R. // *Brain Res. Bull.* 2008. V. 76. № 4. P. 329–343.
36. Snow R., Murphy R. // *Mol. Cell. Biochem.* 2001. V. 224. № 1–2. P. 169–181.
37. Hanna-El-Daher L., Braissant O. // *Amino Acids.* 2016. V. 48. № 8. P. 1877–1895.
38. Dechent P., Pouwels P.J., Wilken B., Hanefeld F., Frahm J. // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. № 3. P. R698–R704.
39. Cooke M., Cribb P.J. // *Nutritional Supplements in Sports and Exercise* / Ed. Greenwood M. Switzerland. Humana press, 2015. P. 259–319.
40. Wyss M., Schulze A. // *Neurosci.* 2002. V. 112. № 2. P. 243–260.
41. Tarnopolsky M.A., Beal M.F. // *Ann. Neurol.* 2001. V. 49. № 5. P. 561–574.
42. Tarnopolsky M.A. // *Subcell. Biochem.* 2007. V. 46. P. 183–204.
43. Wyss M., Kaddurah-Daouk R. // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. № 3. P. 1107–1213.
44. Smith R.N., Agharkar A.S., Gonzales E.B. // *F1000Res.* 2014. V. 3. P. 222.
45. Gualano B., Artioli G.G., Poortmans J.R., Lancha Junior A.H. // *Amino Acids.* 2010. V. 38. № 1. P. 31–44.
46. Lang A.E., Lozano A.M. // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 339. № 15. P. 1044–1053.
47. Beal M.F. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996. V. 6. № 5. P. 661–666.
48. Thomas B., Beal M.F. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. Spec № 2. P. 183–194.
49. Matthews R.T., Ferrante R.J., Klivenyi P., Yang L., Klein A.M., Mueller G., Kaddurah-Daouk R., Beal M.F. // *Exp. Neurol.* 1999. V. 157. № 1. P. 142–149.
50. Yang L., Calingasan N.Y., Wille E.J., Cormier K., Smith K., Ferrante R.J., Beal M.F. // *J. Neurochem.* 2009. V. 109. № 5. P. 1427–1439.
51. Andres R.H., Huber A.W., Schlattner U., Perez-Bouza A., Krebs S.H., Seiler R.W., Wallimann T., Widmer H.R. // *Neurosci.* 2005. V. 133. № 3. P. 701–713.
52. Cunha M.P., Martín-de-Saavedra M.D., Romero A., Egea J., Ludka F.K., Tasca C.I., Farina M., Rodrigues A.L., López M.G. // *ASN Neuro.* 2014. V. 6. № 6. 1759091414554945.

53. *Writing group for the NINDS exploratory trials in Parkinson disease (NET-PD) investigators et al.* // JAMA. 2015. V. 313. № 6. P. 584–593.
54. *Elm J.J., NINDS NET-PD Investigators* // Mov. Disord. 2012. V. 27. № 12. P. 1513–1521.
55. *Parashos S.A., Luo S., Biglan K.M., Bodis-Wollner I., He B., Liang G.S., Ross G.W., Tilley B.C., Shulman L.M., NET-PD investigators* // JAMA Neurol. 2014. V. 71. № 6. P. 710–716.
56. *NINDS NET-PD Investigators.* // Clin. Neuropharmacol. 2008. V. 31. № 3. P. 141–150.
57. *Hass C.J., Collins M.A., Juncos J.L.* // Neurorehabil. Neural Repair. 2007. V. 21. № 2. P. 107–115.
58. *NET-PD NIH.* Statement on the termination of NET-PD LS-1 study. Exploratory trials in Parkinson's Disease 2013. <https://parkinsontrial.ninds.nih.gov/netpd-LS1-study-termination.htm>
59. *Bender A., Klopstock T.* // Amino Acids. 2016. V. 48. № 8. P. 1929–1940.
60. *Graham S.M., Baird M., Boyd G.W.* // Arch. Exerc. Health Dis. 2014. V. 4 № 3. P. 286–298.
61. *Walker F.O.* // Lancet. 2007. V. 369. № 9557. P. 218–228.
62. *Sharp A.H., Loev S.J., Schilling G., Li S.H., Li X.J., Bao J., Wagster M.V., Kotzok J.A., Steiner J.P., Lo A.* // Neuron. 1995. V. 14. № 5. P. 1065–1074.
63. *Koroshetz W.J., Jenkins B.G., Rosen B.R., Beal M.F.* // Ann. Neurol. 1997. V. 41. № 2. P. 160–165.
64. *Matthews R.T., Yang L., Jenkins B.G., Ferrante R.J., Rosen B.R., Kaddurah-Daouk R., Beal M.F.* // J. Neurosci. 1998. V. 18. № 1. P. 156–163.
65. *Grunewald T., Beal M.F.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1999. V. 893. P. 203–213.
66. *Kim J., Amante D.J., Moody J.P., Edgerly C.K., Bordiuk O.L., Smith K., Matson S.A., Matson W.R., Scherzer C.R., Rosas H.D., Hersch S.M., Ferrante R.J.* // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1802. № 7–8. P. 673–681.
67. *Andreassen O.A., Dedeoglu A., Ferrante R.J., Jenkins B.G., Ferrante K.L., Thomas M., Friedlich A., Browne S.E., Schilling G., Borchelt D.R., Hersch S.M., Ross C.A., Beal M.F.* // Neurobiol. Dis. 2001. V. 8. № 3. P. 479–491.
68. *Ferrante R.J., Andreassen O.A., Jenkins B.G., Dedeoglu A., Kuemmerle S., Kubilus J.K., Kaddurah-Daouk R., Hersch S.M., Beal M.F.* // J. Neurosci. 2000. V. 20. № 12. P. 4389–4397.
69. *Dedeoglu A., Kubilus J.K., Yang L., Ferrante K.L., Hersch S.M., Beal M.F., Ferrante R.J.* // J. Neurochem. 2003. V. 85. № 6. P. 1359–1367.
70. *Verbessem P., Lemiere J., Eijnde B.O., Swinnen S., Vanhees L., Van Leemputte M., Hespel P., Dom R.* // Neurology. 2003. V. 61. № 7. P. 925–930.
71. *Hersch S.M., Gevorkian S., Marder K., Moskowitz C., Feigin A., Cox M., Como P., Zimmerman C., Lin M., Zhang L., Ulug A.M., Beal M.F., Matson W., Bogdanov M., Ebbel E., Zaleta A., Kaneko Y., Jenkins B., Hevelone N., Zhang H., Yu H., Schoenfeld D., Ferrante R., Rosas H.D.* // Neurology. 2006. V. 66. № 2. P. 250–252.
72. *Rosas H.D., Doros G., Gevorkian S., Malarick K., Reuter M., Coutu J.P., Triggs T.D., Wilkens P.J., Matson W., Salat D.H., Hersch S.M.* // Neurology. 2014. V. 82. № 10. P. 850–857.
73. *Fukuda D.H., Smith A.E., Kendall K.L., Dwyer T.R., Kerksick C.M., Cramer J.T., Stout J.R.* // J. Strength Cond. Res. 2010. V. 24. № 7. P. 1826–1833.
74. *Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H.* // Lancet. 2006. V. 368. № 9533. P. 387–403.
75. *Maurer I., Zierz S., Moller H.J.* // Neurobiol. Aging. 2000. V. 21. № 3. P. 455–462.
76. *Butterfield D.A., Lauderback C.M.* // Free Radic. Biol. Med. 2002. V. 32. № 11. P. 1050–1060.
77. *Burklen T.S., Schlattner U., Homayouni R., Gough K., Rak M., Szeghalmi A., Wallimann T.* // J. Biomed. Biotechnol. 2006. V. 2006. № 3. P. 35936.
78. *Marques E. P., Wyse T.S.* // Neurotox. Res. 2019. V. 36. № 2. P. 411–423.
79. *Burguera E.F., Love B.J.* // Analyt. Biochem. 2006. V. 350. № 1. P. 113–119.
80. *McGeer P.L., Rogers J., McGeer E.G.* // J. Alzheimers Dis. 2016. V. 54. № 3. P. 853–857.
81. *Ali Mohammadi M., Eshraghian M., Zarindast M., Aliaghaei A., Pishva H.* // Med. J. Islam. Repub. Iran. 2015. V. 29. P. 273.
82. *Cleveland D., Rothstein J.* // Nat Rev Neurosci. 2001. V. 2. № 11. P. 806–819.
83. *Peters O.M., Ghasemi M., Brown R.H., Jr.* // J. Clin. Invest. 2015. V. 125. № 5. P. 1767–1779.
84. *Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X.* // Nature. 1993. V. 362. № 6415. P. 59–62.
85. *Andreassen O.A., Jenkins B.G., Dedeoglu A., Ferrante K.L., Bogdanov M.B., Kaddurah-Daouk R., Beal M.F.* // J. Neurochem. 2001b. V. 77. № 2. P. 383–390.
86. *Groeneveld G.J., Veldink J.H., van der Tweel I., Kalmijn S., Beijer C., de Visser M., Wokke J.H., Franssen H., van den Berg L.H.* // Ann. Neurol. 2003. V. 53. № 4. P. 437–445.
87. *Rosenfeld J., King R.M., Jackson C.E., Bedlack R.S., Barohn R.J., Dick A., Phillips L.H., Chapin J., Gelinas D.F., Lou J.S.* // Amyotroph. Lateral Scler. 2008. V. 9. № 5. P. 266–272.
88. *Shefner J.M., Cudkowicz M.E., Schoenfeld D., Conrad T., Taft J., Chilton M., Urbinelli L., Qureshi M., Zhang H., Pestronk A., Caress J., Donofrio P., Sorenson E., Bradley W., Lomen-Hoerth C., Pioro E., Rezanian K., Ross M., Pascuzzi R., Heiman-Patterson T., Tandan R., Mitsumoto H., Rothstein J., Smith-Palmer T., MacDonald D., Burke D., NEALS Consortium.* // Neurol. 2004. V. 63. № 9. P. 1656–1661.
89. *Dolan E., Gualano B., Rawson E.S.* // Eur. J. Sport Sci. 2019. V. 19. № 1. P. 1–14.
90. *Xiong Y., Gu Q., Peterson P.L., Muizelaar J.P., Lee C.P.* // J. Neurotrauma. 1997. V. 14. № 1. P. 23–34.
91. *Montal M.* // Biochem. Biophys. Acta. 1998. V. 1366. № 1–2. P. 113–126.
92. *Sullivan P.G., Keller J.N., Mattson M.P., Scheff S.W.* // J. Neurotrauma. 1998. V. 15. № 10. P. 789–798.
93. *Sullivan P.G., Geiger J.D., Mattson M.P., Scheff S.W.* // Ann. Neurol. 2000. V. 48. № 5. P. 723–729.
94. *Sakellaris G., Kotsiou M., Tamiolaki M., Kalostos G., Tsapaki E., Spanaki M., Spilioti M., Charissis G.,*

- Evangelidou A.* // J. Trauma. 2006. V. 61. № 2. P. 322–329.
95. *Sakellaris G., Nasis G., Kotsiou M., Tamiolaki M., Charissis G., Evangelidou A.* // Acta Paediatr. 2008. V. 97. № 1. P. 31–34.
 96. *Zhu S., Li M., Figueroa B.E., Liu A., Stavrovskaya I.G., Pasinelli P., Beal M.F., Brown R.H., Kristal B.S., Ferrante R.J., Friedlander R.M.* // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 26. P. 5909–5912.
 97. *Allah Yar R., Akbar A., Iqbal F.* // Brain Res. 2015. V. 1595. P. 92–100.
 98. *Kondo D.G., Hellem T.L., Sung Y.H., Kim N., Jeong E.K., DelMastro K.K., Shi X., Renshaw P.F.* // Depress. Res. Treat. 2011. V. 2011. 650450.
 99. *Gong Y., Chai Y., Ding J.H., Sun X.L., Hu G.* // Neurosci. Lett. 2011. V. 488. № 1. P. 76–80.
 100. *Ågren H., Niklasson F.* // J. Neural Transmis. 1988. V. 74. № 1. P. 55–59.
 101. *Segal M., Avital A., Drobot M., Lukanin A., Derevenski A., Sandbank S., Weizman A.* // Eur. Neuropsychopharmacol. 2007. V. 17. № 3. P. 194–198.
 102. *Dager S.R., Friedman S.D., Parow A., Demopulos C., Stoll A.L., Lyoo I.K., Dunner D.L., Renshaw P.F.* // Arch. Gen. Psychiatry. 2004. V. 61. № 5. P. 450–458.
 103. *Michael N., Erfurth A., Ohrmann P., Arolt V., Heindel W., Pfleiderer B.* // Psychol. Med. 2003. V. 33. № 7. P. 1277–1284.
 104. *Kato T., Takahashi S., Shioiri T., Inubushi T.* // J. Affect Disord. 1992. V. 26. № 4. P. 223–230.
 105. *Allen P.J., D'Anci K.E., Kanarek R.B., Renshaw P.F.* // Neuropsychopharmacol. 2010. V. 35. № 2. P. 534–546.
 106. *Amital D., Vishne T., Roitman S., Kotler M., Levine J.* // J. Clin. Psychiatry. 2006. V. 67. № 5. P. 836–837.
 107. *Roitman S., Green T., Osher Y., Karni N., Levine J.* // Bipolar Disord. 2007. V. 9. № 7. P. 754–758.
 108. *Kondo D.G., Sung Y.H., Hellem T.L., Fiedler K.K., Shi X., Jeong E.K., Renshaw P.F.* // J. Affect. Disord. 2011. V. 135. № 1–3. P. 354–361.
 109. *Pettegrew J.W., Levine J., Gershon S., Stanley J.A., Servan-Schreiber D., Panchalingam K., McClure R.J.* // Bipolar Disord. 2002. V. 4. № 1. P. 61–66.
 110. *Sartorius A., Vollmayr B., Neumann-Haefelin C., Ende G., Hoehn M., Henn F.A.* // Neuroreport. 2003. V. 14. № 17. P. 2199–2201.
 111. *Kato T.* // Trends Neurosci. 2008. V. 31. № 10. P. 495–503.
 112. *MacDonald M.L., Naydenov A., Chu M., Matzilevich D., Konradi C.* // Bipolar Disord. 2006. V. 8. № 3. P. 255–264.
 113. *Chung S., Choi M.S., Ha T.S., Yang J.C., Park T.W., Chung Y.C., Jung A.J.* // Eur. Neuropsychopharmacol. 2009. V. 19. № S3. P. 465–466.
 114. *Feier G., Valvassori S.S., Rezín G.T., Burigo M., Streck E.L., Kapczinski F., Quevedo J.* // Braz. J. Psiquiatr. 2011. V. 33. № 2. P. 171–175.
 115. *Kato T., Takahashi S., Shioiri T., Murashita J., Hamakawa H., Inubushi T.* // J. Affect Disord. 1994. V. 31. № 2. P. 125–133.
 116. *Hamakawa H., Kato T., Shioiri T., Inubushi T., Kato N.* // Psychol. Med. 1999. P. 29. № 3. P. 639–644.
 117. *Allen P.J.* // Neurosci. Biobehav. Rev. 2012. V. 36. № 5. P. 1442–1462.
 118. *Schuff N., Neylan T.C., Lenoci M.A., Du A.T., Weiss D.S., Marmar C.R., Weiner M.W.* // Biol. Psychiatry. 2001. V. 50. № 12. P. 952–959.
 119. *Amital D., Vishne T., Rubinow A., Levine J.* // Am. J. Psychiatry. 2006. V. 163. P. 1840–1841.
 120. *Bertolino A., Callicott J.H., Elman I., Mattay V.S., Tedeschi G., Frank J.A., Breier A., Weinberger D.R.* // Biol. Psychiatry. 1998. V. 43. № 9. P. 641–648.
 121. *Fujimoto T., Nakano T., Takano T., Hokazono Y., Asakura T., Tsuji T.* // Acta Psychiatr. Scand. 1992. V. 86. № 6. P. 455–462.
 122. *Deicken R.F., Calabrese G., Merrin E.L., Vinogradov S., Fein G., Weiner M.W.* // Biol. Psychiatry. 1995. V. 38. № 5. P. 279–286.
 123. *Kato T., Shioiri T., Murashita J., Hamakawa H., Inubushi T., Takahashi S.* // Psychiatry Res. 1995. V. 61. № 3. P. 151–160.
 124. *Calabrese G., Deicken R.F., Fein G., Merrin E.L., Schoenfeld F., Weiner M.W.* // Biol. Psychiatry. 1992. V. 32. № 1. P. 26–32.
 125. *Keshavan M.S., Dick R.M., Diwadkar V.A., Montrose D.M., Prasad K.M., Stanley J.A.* // Schizophr. Res. 2009. V. 115. № 1. P. 88–93.
 126. *Lutkenhoff E.S., van Erp T.G., Thomas M.A., Therman S., Manninen M., Huttunen M.O., Kaprio J., Lonnqvist J., O'Neill J., Cannon T.D.* // Mol. Psychiatry. 2010. V. 15. № 3. P. 308–318.
 127. *Hermesh H., Stein D., Manor I., Shechtman T., Blumensohn R., Meged S., Shiloh R., Benjamini Y., Weizman A.* // J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry. 2002. V. 41. № 9. P. 1045–1053.
 128. *Kaptsan A., Odessky A., Osher Y., Levine J.* // J. Clin. Psychiatry. 2007. V. 68. № 6. P. 881–884.
 129. *Stroup T.* // Am. J. Med. 2007. V. 120. № 4. P. S26–S31.
 130. *Rae C., Digney A.L., McEwan S.R., Bates T.C.* // Proc. Biol. Sci. 2003. V. 270. № 1529. P. 2147–2150.
 131. *Kyoon L.I., Kong S.W., Sung S.M., Hirashima F., Parow A., Hennen J., Cohen B.M., Renshaw P.F.* // Psychiatry Res. 2003. V. 123. № 2. P. 87–100.
 132. *Watanabe A., Kato N., Kato T.* // Neurosci. Res. 2002. V. 42. № 4. P. 279–285.
 133. *McMorris T., Mielcarz G., Harris R.C., Swain J.P., Howard A.* // Neuropsychol. Dev. Cogn. B. 2007. V. 14. № 5. P. 517–528.
 134. *McMorris T., Harris R.C., Howard A.N., Langridge G., Hall B., Corbett J., Dicks M., Hodgson C.* // Physiol. Behav. 2007. V. 90. № 1. P. 21–28.
 135. *Benton D., Donohoe R.* // Br. J. Nutr. 2011. V. 105. № 7. P. 1100–1105.
 136. *Turner C.E., Byblow W.D., Gant N.* // J. Neurosci. 2015. V. 35. № 4. P. 1773–1780.
 137. *Ostojic S.M., Ostojic J., Drid P., Vranes M.* // Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2016. V. 41. № 9. P. 1005–1007.
 138. *Sestili P., Ambrogini P., Barbieri E., Sartin S., Fimognari C., Calcabrini C., Diaz A.R., Guescini M., Polidori E., Luchetti F., Canonico B., Lattanzi D., Cuppini R., Papa S., Stocchi V.* // Amino Acids. 2016. V. 48. № 8. P. 1897–1911.

139. Dickinson H., Bain E., Wilkinson D., Middleton P., Crowther C.A., Walker D.W. // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014. V. 12. CD010846.
140. Нерсесова Л.С., Акопян Ж.И., Арутюнян А.В., Лызлова С.Н. // *Мед. наука Армении.* 2000. Т. 40. № 2. С. 54–57.
141. Нерсесова Л.С., Косян С.А., Акопян Ж.И. // *Биол. журн. Армении.* 1988. Т. 41. № 12. С. 976–979.
142. Pavlova N.G., Konstantinova N.N., Arutyunyan A.V. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1999. V. 17. № 8. P. 839–848.
143. Додхоев Д.С., Евсюкова И.И., Тумасова Ж.Н., Арутюнян А.В. // *Журн. акуш. и жен. болезн.* 2003. Т. 52. № 4. С. 28–32.
144. Genc G., Okuyucu A., Meydan B.C., Yavuz O., Nisbet O., Hokelek M., Bedir A., Ozkaya O. // *Ren. Fail.* 2014. V. 36. № 7. P. 1108–1113.
145. Curt M.J., Voicu P.M., Fontaine M., Dessein A.F., Porchet N., Mulliez K.M., Dobbelaere D., Soto-Ares G., Cheillan D., Vamecq J. // *Biochimie.* 2015. V. 119. P. 146–165.
146. Sharma M., Tiwari M., Tiwari R.K. // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2015. V. 117. № 5. P. 287–296.
147. Арутюнян А.В., Милютин Ю.П., Щербицкая А.Д., Керкешко Г.О., Залозная И.В., Михель А.В. // *Биохимия.* 2020. Т. 85. № 2. С. 248–259.
148. Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Y.P., Tumanova N.L., Zalozniaia I.V., Kerkeshko G.O., Arutjunyan A.V. // *Neurotox. Res.* 2020. V. 38. № 2. P. 408–420.
149. Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Y.P., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Zalozniaia I.V., Arutjunyan A.V. // *Cells.* 2021. V. 10. № 6. 1536.
150. Bereket-Yucel S. // *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 2015. V. 55. № 4. P. 313–319.
151. Ardalan M., Batista E.D., Titgemeyer E.C. // *J. Anim. Sci.* 2020. V. 98. № 3. skaa072.
152. Mun G.I., Kim S., Choi E., Kim C.S., Lee Y.S. // *Arch. Pharm. Res.* 2018. V. 41. № 11. P. 1033–1050.
153. Hall E.J., Giaccia A.J. // *Radiobiology for the Radiologist.* USA: Walters Kluwer, 2012. 576P.
154. Petrosyan M.S., Nersesova L.S., Adamyan N.H., Gazaryants M.G., Akopian J.I. // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. № 3. P. 295–301.
155. Нерсесова Л.С., Петросян М.С., Каралова Е.М., Аветисян А.С., Аброян Л.О., Акопян Л.А., Каралян З.А., Акопян Ж.И. // *Радиаци. биол. Радиоэкол.* 2019. Т. 59. № 6. С. 592–609.
156. Нерсесова Л.С., Петросян М.С., Бабаян Н.С., Тадевосян Г.Л., Хондкарян Л.Г., Акопян Ж.И. // *Радиация и риск.* 2019. Т. 28. № 3. С. 119–131.

The Neuroprotective Potential of Creatine. The Hidden Resources of Its Therapeutic and Prophylactic Use

L. S. Nersesova^a, M. S. Petrosyan^a, and A. V. Arutjunyan^b

^a *Institute of Molecular Biology of NAS RA, Yerevan, Republic of Armenia*

^b *St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, Russia*

An extensive stock of data has been accumulated in the scientific literature, indicating the neuroprotective potential of creatine (Cr). However, while many recent experimental and clinical studies confirm the previously revealed neuroprotective therapeutic effects of Cr as a food supplement, there is a range of clinical results associated with a number of diseases that are of somewhat dubious nature. The primary purpose of this review is to summarize the experimental data that unequivocally indicate the effectiveness of the neuroprotective effect of Cr. At the same time, it is vitally important to discuss some of the latest controversies linked to several clinical trials involving Cr, as well as the prospects for its therapeutic and preventive use. As evident from the discussion of the data and analysis presented in the review, the advantages of Cr as a food supplement are not limited to its use in high-intensity and rehabilitation physical exercises, but can have much wider application, whether among generally healthy people or population groups with various clinical issues. Despite some of the ambivalent data derived from several clinical trials, most researchers are confident that further studies with improved protocols will be capable of confirming the neuroprotective therapeutic potential of Cr for neurodegenerative diseases. With all fairness, even today we can talk about the well-established benefits of Cr in the context of Huntington's disease, as well as the traumatic brain damage. Notwithstanding schizophrenia, the data available point out to the possible positive therapeutic effect of Cr for a number of mental disorders, including depression, post-traumatic stress disorder. It is obvious that the protective potential of Cr as a natural adaptogen has not been fully uncovered yet. Thus, it is reasonable to expect the spectrum of its areas of application to only grow based on the results of the research activities currently in progress.

Keywords: creatine, food supplement, neuroprotective effect, neurodegenerative and mental disorders, cognitive abilities, untapped potential of creatine

УДК 612.82+612.884

РОЛЬ ПЕПТИДА, АКТИВИРУЮЩЕГО АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ ГИПОФИЗА И ВАЗОАКТИВНОГО ИНТЕСТИНАЛЬНОГО ПЕПТИДА В ПАТОГЕНЕЗЕ МИГРЕНИ

© 2022 г. А. Ю. Соколов^{1, 2, *}, А. В. Осипчук¹, Я. Б. Скиба^{1, 3}, А. В. Амелин⁴

¹Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУН “Институт физиологии им. И.П. Павлова” Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴Кафедра неврологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 26.06.2021 г.

После доработки 06.07.2021 г.

Принята к публикации 07.07.2021 г.

В статье представлен обзор экспериментально-клинических данных, свидетельствующих об участии пептида, активирующего аденилатциклазу гипофиза (РАСАР) и вазоактивного кишечного пептида (VIP) в механизмах формирования первичных головных болей, в частности, мигрени. Приведены сведения о вовлечении указанных медиаторов и их рецепторов в регуляцию тонуса краиниальных сосудов и ноцицепции, в том числе в тригемино-вазкулярной системе. Обсуждаются перспективы использования фармакологических средств, блокирующих РАСАР-ергическую медиацию, в качестве потенциальных антицефалгических препаратов.

Ключевые слова: головная боль, мигрень, тройничный нерв, пептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза (РАСАР), вазоактивный кишечный пептид (VIP)

DOI: 10.31857/S1027813322010125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота

ГБ — головная боль

ГБН — головная боль напряжения

КГБ — кластерная головная боль

МКАТ — моноклональные антитела

РНК — рибонуклеиновая кислота

СЯТН — спинальное ядро тройничного нерва

ТГ — тройничный ганглий

ТМО — твердая мозговая оболочка

MrgB₃-рецептор (mas-related G-protein coupled receptor member B3) — подтип орфанного метаботропного рецептора, связанного с протоонкогеном MAS1

РАСАР (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) — пептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза

TRPA1 — канал транзитного рецепторного потенциала подсемейства А типа 1

VIP (vasoactive intestinal peptide) — вазоактивный кишечный пептид

ВВЕДЕНИЕ

Мигрень представляет собой хроническое заболевание, проявляющееся приступами головной боли (ГБ) различной частоты и интенсивности, преимущественно пульсирующего характера, односторонней локализации и, как правило, сопровождающейся различными сенсорными и вегетативными нарушениями. Наряду с ГБ напряжения (ГБН) и группой тригеминальных автономных цефалгий, включающей кластерную ГБ (КГБ), мигрень относится к т. наз. первичным ГБ, которые не имеют определенной этиологии и диагностируются на основании характерной клинической картины [1].

Согласно классической теории, мигрень рассматривается как нейро-сосудистое расстройство, в основе патогенеза которого лежит нарушение взаимодействия между артериями и венами головы, тройничным нервом и структурами ЦНС, анатомически связанными в функционально единую тригемино-вазкулярную систему (ТВС). Мигреноз-

* Адресат для корреспонденции: 197022 Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; e-mail: alexey.y.sokolov@gmail.com.

ная атака возникает как следствие активации ТВС, происходящей спонтанно или под действием различных экзо- и/или эндогенных факторов [2, 3] в условиях врожденного или приобретенного дефицита нисходящих антиноцицептивных влияний и приводящей к развитию краниальной вазодилатации и, вероятно, асептического нейрогенного воспаления сосудов мозговых оболочек и перивазальных тканей за счет антидромного высвобождения из периферических окончаний тригеминальных афферентов различных вазоактивных веществ, например, кальцитонин-ген родственного пептида (CGRP), субстанции P, монооксида азота (NO) и т.д. В этих условиях происходит ортодромная стимуляция периваскулярных А- δ и С-волокон нейронов тройничного ганглия (ТГ), которые передают ноцицептивную информацию от внечерепных, мозговых и менингеальных сосудов в спинальное ядро тройничного нерва (СЯТН), где осуществляется ее первичная обработка и дальнейшая трансмиссия в вышележащие структуры ЦНС. Аксоны клеток СЯТН формируют восходящие связи с различными субкортикальными областями мозга, включая таламус, который служит последней релейной инстанцией в передаче болевого сигнала соматосенсорным зонам коры [4–6]. Нейрососудистые нарушения в совокупности с увеличением ноцицептивного трафика сопровождаются развитием периферической и центральной сенситизации нейрональных звеньев тригемино-таламо-кортикального пути, что клинически будет проявляться характерным болевым синдромом, кожной аллодинией, фото-/фоно-/осмофобией и, нередко, тошнотой и рвотой [7–11]. Стоит отметить, что “тригемино-васкулярная” теория патогенеза мигрени постоянно подвергается существенным корректировкам в свете новых клинических и экспериментальных наблюдений.

В нейрохимических механизмах формирования мигрени принимает участие множество медиаторных систем и модулирование их работы с помощью различных фармакологических средств, например, агонистов 5-НТ₁-рецепторов, ГАМК-миметиков или бета-адреноблокаторов, оказывает более или менее заметный терапевтический эффект у лиц с этим заболеванием [12–16]. Не менее 20 лет в фокусе стойкого интереса ученых находится пептид, родственник гену кальцитонина (CGRP), который на сегодняшний день небезосновательно рассматривается как ключевая “промигренозная” молекула [17]. Выявление важного значения CGRP в патогенезе мигрени позволило создать принципиально новые классы препаратов со специфическими антимигренозным действием — моноклональные антитела (МКАТ) к CGRP или его рецептору, использующиеся в профилактическом лечении [18], и низкомолекулярные блокаторы рецепторов CGRP, так называемые “гепанты”, при-

меняемые для купирования атаки ГБ, хотя их превентивный потенциал также изучается [19, 20].

Однако вовлеченность пептидергической медиации в патофизиологию мигрени не ограничивается участием одного CGRP: за последнее десятилетие прогрессивно увеличивается число экспериментально-клинических доказательств схожей роли пептида, активирующего аденилатциклазу гипофиза (PACAP) и, в меньшей мере, вазоактивного интестинального пептида (VIP).

РАСАР И VIP: ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Выделенный из гипоталамуса овцы в конце 80-х гг. прошлого века, PACAP получил свое название из-за способности стимулировать аденилатциклазу в культуре клеток переднего гипофиза крысы [21, 22]. Существует две формы пептида (состоящие из 27 или 38 аминокислотных остатков), равные по биологической активности и имеющие функциональное и структурное сходство с VIP, впервые изолированным из кишки свиньи и описанным Mutt & Said в 1974 г. [23, 24].

Физиологические эффекты VIP и PACAP опосредуются тремя рецепторами: VPAC₁, VPAC₂ и PAC₁, причем чувствительность последнего к PACAP в сотни раз выше, чем к VIP, а аффинитет обоих пептидов к VPAC-рецепторам примерно одинаковый, в связи с чем PAC₁-рецептор нередко рассматривается как специфичный для PACAP. Все рецепторы являются метаботропными и сопряженными с Gs-протеином, стимулирующим аденилатциклазу, хотя PAC₁-рецептор также ассоциирован с Gq/G11-белком, повышающим активность фосфолипазы C [22, 25–28]. Обе формы PACAP и VIP обнаружены в различных тканях и являются медиаторами с широким спектром биологических функций, к числу которых можно отнести регуляцию циркадианных ритмов, термогенеза, стрессорного ответа, репродукции и клеточной пролиферации, контроль сократимости гладкой мускулатуры и тканевой перфузии, а также модулирование работы иммунной и нервной систем, включая ноцицептивную трансмиссию. Оба пептида выступают в качестве парасимпатических котрансмиттеров, усиливая вегетативные эффекты ацетилхолина. VIP и PACAP в совокупности со своими VPAC/PAC₁-рецепторами нередко рассматриваются как единая пара-/ауто-/эндокринная лиганд-рецепторная система, вовлеченная в патогенез различных заболеваний, в частности, ряда аутоиммунных патологий, системных и органических воспалительных процессов, психических расстройств, нейродегенеративных состояний и новообразований [15, 24, 29–35].

НЕКОТОРЫЕ ФАКТЫ, СВИДЕТЕЛЬСТВУЮЩИЕ О ВОВЛЕЧЕНИИ РАСАР И VIP В ПАТОГЕНЕЗ ЦЕФАЛГИЙ

Иммуногистохимические исследования. Результаты иммуногистохимических исследований на животных подтверждают экспрессию РАСАР и/или его рецепторов в анатомических структурах, релятивных развитию цефалгий, в частности, СЯТН, стволовых ядрах, крылонебном, ушном и тройничном ганглиях, таламусе и гипоталамусе, коре, а также в краниальных артериях. В нейронах малого размера ТГ и ряде образований ЦНС РАСАР может быть колокализован с CGRP [24–26, 30, 36, 37].

Лабораторная и инструментальная диагностика. У пациентов с эпизодической мигренью содержание РАСАР-38 в венозной крови в межприступный период существенно ниже, чем у здоровых лиц, а во время атаки заболевания оно значительно повышается и нормализуется на фоне успешного применения 5HT_{1b/1d}-агониста суматриптана — специфического антимигренозного препарата abortивного типа действия [38, 39]. Стоит отметить, что суматриптан не изменял уровни РАСАР и VIP в интра- и экстрацеребральной циркуляции у здоровых волонтеров [40]. Аналогичные изменения концентрации РАСАР-38, т.е. ее повышение при обострении и снижение при затихании заболевания, наблюдались и при эпизодической КГБ [41]. С помощью диффузионной тензорной МРТ у 26 пациентов с мигренью (с аурой и без) была обнаружена корреляция между наличием микроструктурных изменений в белом веществе головного мозга и низким межприступным плазменным уровнем РАСАР-38 [42].

У пациентов с хронической мигренью в межприступный период плазменные уровни РАСАР и VIP были выше, чем у лиц с эпизодической формой этой ГБ и у здоровых субъектов; авторы расценили РАСАР как своего рода биомаркер хронизации мигрени [43]. Эти результаты противоречат более ранним данным, согласно которым содержание РАСАР в венозной крови пациентов с хронической, равно как и эпизодической, мигренью вне обострения ниже по сравнению с аналогичным показателем здоровых лиц. В этом же исследовании было показано, что у страдающих ГБН в период между приступами концентрация этого пептида не отличается от таковой в контрольной группе [44]. Годом позже Cernuda-Mogollón et al. вообще не обнаружили различий в содержании РАСАР в сыворотке здоровых женщин и пациенток с эпизодической и хронической мигренью вне атаки ГБ, в то время как уровень VIP оказался существенно выше в цефалгической группе по сравнению с контрольной когортой [45]. Авторы рассматривают VIP как маркер парасимпатической активации при хронической мигрени, хотя в более раннем исследовании схожего дизайна делают вывод, что уровень VIP не позволяет однозначно дифференцировать хрониче-

скую форму ГБ от эпизодической [46]. Интересно, что у детей и подростков возраста 6–18 лет с диагнозом “мигрень без ауры” плазменные уровни РАСАР-38 и VIP как во время цефалгических атак, так и между ними оказались значимо выше, чем у здоровых молодых людей [47].

Показано, что, в отличие от содержания РАСАР, уровень VIP в венозной крови возрастает в момент мигренозного приступа только у пациентов с заметными вегетативными проявлениями [48], более того, у лиц с хронической мигренью установлена позитивная корреляция между концентрацией VIP и выраженностью автономных парасимпатических симптомов [49]. В то же время при обострениях КГБ плазменный уровень этого пептида повышается всегда, параллельно с ростом содержания РАСАР [48]. Действительно, высвобождение VIP имеет большое значение в генезе вегетативных “лицевых” симптомов (лакримация, ринорея, сужении зрачка и т.д.), характерных прежде всего для приступов тригеминальных автономных цефалгий, при которых наиболее ярко проявляются признаки тригемино-парасимпатической активации [50]. Биохимическими маркерами этих заболеваний, свидетельствующими о сочетанном вовлечении чувствительных и парасимпатических нервов, являются CGRP и VIP, высокие плазменные уровни которых нормализуются после успешного купирования атаки ГБ [51]. Схожие биохимические сдвиги наблюдались и у пациентов с атипичной, замаскированной под ассоциированную с риносинуситом ГБ, мигренью, повышенная концентрация VIP и CGRP в слюне которых уменьшалась параллельно с облегчением боли после приема суматриптана [52]. У пациентов с хронической мигренью вероятность клинического ответа на терапию ботулиническим токсином типа А имела прямо пропорциональную зависимость от степени повышения CGRP и, в меньшей степени, VIP в венозной крови в межприступный период [53].

Моделирование цефалгий на животных. У кошек одновременное высвобождение CGRP и РАСАР в кровь яремной вены провоцировалось электростимуляцией твердой мозговой оболочки (ТМО) [39]. У крыс накопление РАСАР в СЯТН индуцировалось внутрибрюшинным введением нитроглицерина, являющимся классическим триггером активации ТВС [54], или электрическим раздражением ТГ; последнее также сопровождалось повышением плазменной концентрации нейропептида [38]. У крыс введение в вибрисную подушку полного адъюванта Фрейнда сопровождалось повышением концентрации CGRP и предшественника РАСАР (preproPACAP) в СЯТН с параллельным развитием фациальной механической аллодинии, причем наблюдавшееся спустя 72 ч после инъекции максимальное снижение порогов чувствительности совпадало во времени с пиковыми значениями уровней нейропептидов [55].

Повторяющаяся в течение 21 дня химическая дуральная стимуляция смесью провоспалительных веществ у крыс сопровождалась снижением содержания PACAP-38 в плазме и ТГ параллельно с увеличением экспрессии мРНК и компонентов PAC1 — рецептора в ТГ, но не в СЯТН, при этом экспрессия VPAC1- и VPAC2-рецепторов не изменялась [56]. Однако в более позднем исследовании на бодрствующих крысах хроническая (до 7 дней) электростимуляция ТМО приводила к усилению экспрессии CGRP, PACAP и PAC1-рецепторов в ТГ и СЯТН [57]. Несколько противоречивые итоги двух последних работ, авторы которых пытались методически сымитировать у животных состояние хронической мигрени, вполне сопоставимы с описанными выше неоднородными результатами оценки плазменного уровня PACAP у лиц с этим заболеванием.

PACAP и VIP как провокаторы приступа ГБ. Внутривенная инфузия PACAP-38 сопровождалась появлением ГБ как у здоровых субъектов, так и у лиц с мигренью [58, 59], причем у большинства последних мигренеподобная ГБ была заметно отсроченной [24, 26], что напоминает аналогичный эффект нитроглицерина [54] и CGRP [60]. Введение PACAP приводило к существенному увеличению плазменных концентраций VIP, пролактина и тиреотропина, но не фактора некроза опухоли альфа и CGRP [61]. В отличие от действия CGRP, назначение PACAP вызывало почти у половины пациентов с мигренью появление характерной продромальной симптоматики [62]. В двойном слепом, плацебо-контролируемом исследовании (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03881644>) внутривенное введение суматриптана непосредственно после инфузии PACAP-38 предотвращало возникновение ГБ у пациентов с мигренью без ауры [63]. В настоящее время PACAP-38 рассматривается наряду с нитроглицерином и CGRP как валидный фармакологический триггер мигренозной атаки и используется при проведении провокационных тестов у лиц с этим заболеванием [64]. Результаты недавних исследований демонстрируют возможность применения для этой цели и PACAP-27, введение которого сопровождалось появлением ГБ как у здоровых людей, так и у пациентов с мигренью [65, 66]. Стоит отметить, что обе формы PACAP проникают через гемато-энцефалический барьер, однако есть сведения, что после прохождения через базальную мембрану эндотелия пептид подвергается либо быстрой деградации, либо эффлюксу из нервной ткани обратно в кровь, в связи с чем высказывается осторожное предположение, что его цефалгический эффект едва ли реализуется посредством центральных механизмов [67].

По данным разных авторов, назначение VIP либо не провоцировало развитие приступа ГБ [58, 68], либо вызывало у здоровых субъектов появление слабой кратковременной боли [69], либо способствовало появлению мигренеподобной ГБ у

менее 20% исследуемых пациентов с мигренью [59]. Не исключено, что скромная по сравнению с PACAP способность VIP провоцировать ГБ связана с методологией проводимых исследований и/или его фармакокинетическими особенностями, например, периодом полужизни в плазме, который в разы меньше такового PACAP [26]. Во всяком случае, в более свежей работе продолжительное (2 ч) введение VIP вызывало у здоровых испытуемых симптом парасимпатической активации (слезотечение), а также ГБ в раннем (1 ч) и позднем (4–12 ч) постинфузионных периодах [70].

ВЛИЯНИЕ PACAP И VIP НА ТОНУС КРАНИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ

VIP и PACAP вызывают эндотелий-независимую краниальную вазодилатацию, при этом данные об опосредующих этот процесс рецепторах противоречивы [64]. Так, в опытах на крысах с использованием метода прижизненной микроскопии было показано, что оба пептида вызывают расширение средней менингеальной артерии, причем, несмотря на экспрессию в этом сосуде матричной РНК всех трех подтипов рецепторов, только VPAC1-антагонист PG97-269, но не блокаторы VPAC2- или PAC1-рецепторов, отменяет их действие [71]. Позже в исследовании *ex vivo* вызванная PACAP релаксация указанного сосуда отменялась PAC1-антагонистом PACAP(6–38) [72]. В еще более позднем исследовании индуцированная внутривенным назначением PACAP и VIP кратковременная менингеальная вазодилатация носила VPAC2-зависимый характер, а PAC1-антагонист подавлял нейрогенную дуральную вазодилатацию, спровоцированную чрезкостной электростимуляцией ТМО [73].

У крыс PACAP вызывает дегрануляцию дуральных тучных клеток и его расслабляющий эффект на стенку интракраниальных сосудов может быть частично опосредован высвобождающимися из этих клеток вазоактивными веществами [26, 74]. Во всяком случае, у животных с истощенными мастоцитами, равно как и на фоне предварительного назначения антигистаминных препаратов, расширение средней менингеальной артерии в ответ на PACAP-38 было значимо менее выражено, чем у интактных особей [75]. Стоит отметить, что в опытах *in vitro* дегранулирующая способность была существенно выше у PACAP-38 в сравнении с PACAP-27 и VIP [76, 77]. Кроме того, PAC1-антагонист PACAP(6–38) столь же интенсивно как и сам PACAP-38 вызывал дегрануляцию менингеальных тучных клеток, причем эффект обоих пептидов реализовался не через VPAC-/PAC1-рецепторы, а при посредничестве орфанных MrgB₃-рецепторов [77]. Интересно, что из всех нейропептидов, вовлеченных в патофизиологию мигрени, только PACAP содержится в мастоцитах человека и может высвобождаться из них посредством классического IgE-опосредованного механизма

активации [78]. Впрочем, Н1-блокатор клемастин не предотвращал развитие ГБ у пациентов с мигренью после инфузии РАСАР-38 и не влиял на содержание в крови триптазы и фактора некроза опухоли альфа; авторы делают вывод о маловероятной роли гистамина, равно как и самого процесса дегрануляции мастоцитов, в возникновении РАСАР-индуцированной цефалгии [79].

Внутривенное введение VIP или РАСАР-38 как здоровым добровольцам, так и пациентам с мигренью сопровождалось уменьшением объемной скорости кровотока по средней мозговой артерии и/или расширением поверхностной височной артерии [58, 68–70], причем последний эффект в случае применения РАСАР был суматриптан-обратимым [63]. Интересно, что у субъектов с розацеа инфузия РАСАР-38 сопровождалась не только увеличением диаметра поверхностной височной артерии, но и заметной гиперемией и отеком кожи лица, что также устранялось внутривенным введением суматриптана [80]. По данным МР-ангиографии у женщин с мигренью оба пептида расширяли экстра-, но не интракраниальные артерии, при этом РАСАР-38-вызванная вазодилатация длилась заметно дольше [59]. Кроме того, у здоровых волонтеров РАСАР-38 незначительно снижал регионарный кровоток в различных участках мозга [81] и вызывал расширение средней менингеальной, но не средней мозговой артерий [82], в то время как РАСАР-27 провоцировал расширение средней менингеальной, поверхностной височной и наружной сонной и сужение средней мозговой и внутренней сонной артерий [65]. Уместно отметить, что нейропротективное действие РАСАР при церебральной ишемии, показанное в исследованиях на животных, едва ли реализуется посредством усиления кровотока в очаге поражения, а скорее связано с антиапоптотическим и противовоспалительным эффектами пептида [83].

Анализируя представленные выше данные можно заметить, что VIP всегда индуцирует заметную дилатацию краниальных артерий, но, по сравнению с РАСАР, вызывает ГБ реже и гораздо меньшей интенсивности и продолжительности, хотя есть и исключения, о чем уже говорилось ранее [70]. Тем не менее, это наблюдение подтверждает представление о том, что расширение мозговых сосудов едва ли является первопричиной и определяющим фактором возникновения приступа мигрени [10].

ВЛИЯНИЕ РАСАР И VIP НА НОЦИЦЕПЦИЮ

Общие представления. Имеющиеся сведения о роли этих пептидов и их рецепторов в ноцицепции крайне противоречивы [25], что может частично объясняться различиями в условиях проведения исследований. У здоровых волонтеров внутривенная инъекция РАСАР-38 и VIP сопровождалась появлением умеренной боли и заметной вазомоторной реакцией в области введения [84].

Вместе с тем в опытах на животных было показано, что влияние РАСАР на болевую трансмиссию зависит от механизма ноцицептивной активации и способа назначения пептида. У крыс на модели острой соматической боли РАСАР-38 при локальном введении проявлял антиаллодиническое и антигипералгетическое действия и подавлял ноцицептивное поведение в обеих фазах формалинового теста. У мышей при подкожной инъекции пептид демонстрировал анальгетические свойства на модели висцеральной воспалительной боли, но был неэффективен при нейропатической механической гипералгезии, а при местном назначении вызывал периферическую сенситизацию. Вся обозначенная активность РАСАР предупреждалась предварительным введением VPAC1/VPAC2-антагонистов, но не PAC1-блокаторов [85]. При этом PAC1-дефицитные мыши демонстрировали 75% уменьшение реакции во вторую фазу формалинового теста, что подтверждает вовлечение РАСАР и PAC1-рецепторов в медиацию ноцицептивных ответов при хронических воспалительных состояниях [86]. Действительно, интратекальное назначение блокатора этих рецепторов РАСАР(6-38) сопровождалось подавлением термальной гипералгезии и механической аллодинии, связанных с воспалительной и нейропатической болями [87]. По сравнению с дикими особями, РАСАР-дефицитные мыши демонстрировали менее выраженные реакции в обеих фазах формалинового теста и на модели острой висцеральной ноцицепции, у них не развивалась механическая гипералгезия при перевязке седалищного нерва или локальном введении в лапу резинифератоксина, хотя появлялась термальная аллодиния [88]. При интратекальном введении у мышей РАСАР демонстрировал двойственное влияние на ноцицепцию – анальгезию непосредственно после инъекции (увеличение латентности в тесте отдергивания хвоста) и последующую длительную (до 60 мин) гипералгезию, заключающуюся в развитии болевого поведения [89].

Что касается VIP, то на модели воспалительной боли было показано, что он может сенситизировать периферические окончания афферентных нейронов [90]. Аналогично влиянию РАСАР, интратекальное введение VIP вызывало двухфазный эффект – первоначальная антиноцицепция сменялась гипералгезией [91]. Аппликация VIP в миндалевидное тело сопровождалась угнетением рефлекса отдергивания хвоста; в качестве объяснения этому высказывалось предположение о возможном участии VIP в активации нисходящей антиноцицептивной системы [92].

Ноцицептивная трансмиссия в системе тройничного нерва. РАСАР рассматривается как важный медиатор активации и сенситизации ТВС. У нокаутированных по гену РАСАР мышей – в отличие от диких особей – нитроглицерин вызывал существенно менее выраженные фотофобию, увеличение менингеального кровотока и усиление

ние экспрессии *c-fos* белков в ТГ и СЯТН [93]. Как и CGRP [94], PACAP вызывает у мышей непереносимость света [95], что служит индикатором развития сенситизации нейронов ретино-таламо-кортикального пути — процесса, участвующего в генезе ассоциированной с мигренью светобоязни [96].

В опытах на крысах PACAP-38, но не VIP, спустя 3 ч после внутривенного введения вызывал стойкое усиление фоновой активности нейронов СЯТН и их реакций на экстра- и интракраниальную стимуляцию, а интрацеребровентрикулярная микроинъекция PAC1- и VPAC1-антагонистов подавляла А-дельта ответы указанных клеток на электро-раздражение ТМО [73]. В экспериментах *ex vivo* PACAP-38, но не VIP, индуцировал высвобождение CGRP в СЯТН, но не в ТГ, причем без посредничества классических VPAC/PAC1-рецепторов [97]. В свою очередь, у крыс после удаления левого верхнего шейного симпатического ганглия увеличение количества дуральных мастоцитов и повышение *c-fos*-экспрессии в ипсилатеральном СЯТН нивелировалось 5-дневным назначением VIP, что с очень широких позиций можно трактовать как потенциальный антицефалгический эффект [98].

У мышей PACAP, но не VIP, при подкожной инъекции в периорбитальную область вызывал локальную дозозависимую механическую аллодинию, отменяемую местным или системным назначением PAC1-блокаторов, что говорит о вовлечении PACAP в механизм развития периферической сенситизации тройничных афферентов [99].

Действительно, в культуре нейронов ТГ мышей и крыс после назначения PACAP, VIP и селективного PAC1-агониста максидилана определялось повышение концентрации внутриклеточного кальция, причем, такие же изменения происходили и на фоне применения блокаторов VPAC-/PAC1-рецепторов PACAP(6–38), VIP(6–28) и M65. Авторы делают предположение, что парадоксальный одинаковый эффект фармакодинамически противоположных субстанций может опосредоваться некими неизвестными рецепторами или сигнальными путями [100]. Стоит заметить, что выше уже говорилось о равном потенциале PACAP и PACAP(6–38) в отношении деградации мастоцитов и роли в этом процессе $MrgB_3$ -рецепторов [77], равно как и о неучастии VPAC/PAC1-рецепторов в обеспечении стимулированного PACAP высвобождения CGRP в СЯТН [97]; все эти данные говорят в пользу существования альтернативных схем PACAP-ергической трансмиссии.

Внутривенное назначение крысам МКАТ к PAC1-рецептору грызунов Ab181 сопровождалось снижением частоты вызванных дуральной электростимуляцией спайков нейронов СЯТН без нарушения их спонтанной активности, при этом угнетающий эффект был сопоставим с таковым суматриптана. Иммуногистохимический анализ показал наличие участков связывания Ab181 в

тройничном и крылонебном ганглиях, но не в СЯТН, верхнем слюноотделительном ядре, таламусе и гипоталамусе, что говорит скорее о периферическом действии данного препарата [48] и напоминает фармакодинамику МКАТ к CGRP [101, 102]. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты исследования *ex vivo*, в котором на полусферах голов крыс было показано, что вызванное капсаицином или ионами калия высвобождение PACAP происходит исключительно в пределах ТГ, более того, в отличие от CGRP, PACAP не выделяется из менингеальных окончаний С-волокон тройничного нерва [103].

АНТИ-РАСАР ПРЕПАРАТЫ КАК НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ТЕРАПИИ ЦЕФАЛГИЙ

Накопленные на сегодняшний день сведения позволяют рассматривать PACAP в качестве важного игрока в патофизиологии первичных цефалгий, способствующего их развитию. Исходя из этого, представляется целесообразным разработка фармакологических средств, блокирующих сам пептид или его рецепторы [26, 32, 36], тем более, что результаты доклинических исследований МКАТ к PAC1-рецептору (Ab181) или PACAP (ALD1910) выглядят весьма оптимистично. Как уже обсуждалось в предыдущем разделе, Ab181 угнетал ответы клеток СЯТН на электростимуляцию ТМО [48]. В свою очередь, ALD1910 *in vitro* ингибировал PACAP-индуцированное накопление цАМФ в клеточных линиях нейробластомы человека и феохромоцитомы крысы, а *in vivo* подавлял вызванные TRPA1-агонистом умбеллулоном повышение температуры кожи морды (рассматривалось авторами как суррогат нейрогенной вазодилатации) и лакримацию у крыс [104].

Однако, результаты фазы 2а рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования эффективности и безопасности AMG 301 — человеческого МКАТ к PAC1-рецептору — в качестве средства профилактики эпизодической и хронической мигрени (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03238781>) оказались негативными. Количество дней с мигренью в месяц на фоне подкожного введения AMG 301 (210 мг каждый месяц или 420 мг каждые 2 нед.) в конце 12-недельного курса снизилось не существенно как в двух основных группах, так и в контрольной когорте; по вторичным исходам также не было выявлено межгрупповых различий [105]. Авторы и их коллеги пытаются объяснить отсутствие эффекта различными причинами, включая недостаточную концентрацию препарата для достижения полной PAC1-блокады, шунтирование действия PACAP через VPAC-рецепторы, а также отсутствие стратификации участников исследования по наличию симптомов парасимпатической активности — при выраженности последних у AMG 301 теоретически было бы больше шансов проявить эффективность [32, 48].

По состоянию на июнь 2021 г. результаты фазы I рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования безопасности, переносимости и фармакокинетики ALD1910 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04197349>) не опубликованы.

Тем не менее, несмотря на неудовлетворительные результаты первого клинического испытания, работа в направлении создания и изучения фармакологических средств, модулирующих медиацию PACAP, может привести к появлению принципиально новых препаратов для лечения цефалгий, а также некоторых неврологических, психических и метаболических заболеваний [106].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие PACAP и его рецепторов в процессах формирования мигрени не вызывает сомнений, а их потенциал в качестве фармакологических мишеней антицефалгических препаратов бесспорно высок [24–26, 30, 32, 36, 104–106]. Вместе с тем, тотальное подавление PACAP-ергической медиации может привести к крайне нежелательным последствиям, поскольку некоторые из эффектов PACAP являются критически важными для поддержания нормальных физиологических функций [31, 33–35]. Разнообразие опосредуемых PACAP биологических реакций, а также выявление его VPAC/PAC1-независимых сигнальных путей, предопределяют необходимость более детального изучения этого пептида, в том числе в контексте его вовлечения в патогенез цефалгий. С теоретической точки зрения избирательное модулирование трансмиссии PACAP в пределах ТВС поможет эффективно и безопасно контролировать мигрень. Что касается VIP, то на сегодняшний день его роль в механизмах развития ГБ остается дискуссионной.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Headache Classification Committee of the International Headache Society // *Cephalalgia*. 2018. V. 38. P. 1–211.
- Lambert G.A., Zagami A.S. // *Headache*. 2009. V. 49. P. 253–275.
- Kesserwani H. // *Cureus*. 2021. V. 13. e14243.
- Nosedá R., Burstein R. // *Pain*. 2013. V. 154. P. 44–53.
- Ashina M., Hansen J.M., Do T.P., Melo-Carrillo A., Burstein R., Moskowitz M.A. // *Lancet Neurol*. 2019. V. 18. P. 795–804.
- Haanes K.A., Edvinsson L. // *CNS Drugs*. 2019. V. 33. P. 525–537.
- Pietrobon D., Moskowitz M.A. // *Annu. Rev. Physiol.* 2013. V. 75. P. 365–391.
- Burstein R., Nosedá R., Borsook D. // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. P. 6619–6629.
- Akerman S., Romero-Reyes M., Holland P.R. // *Pharmacol. Ther.* 2017. V. 172. P. 151–170.
- Goadsby P.J., Holland P.R., Martins-Oliveira M., Hoffmann J., Schankin C., Akerman S. // *Physiol. Rev.* 2017. V. 97. P. 553–622.
- Hoffmann J., Baca S.M., Akerman S. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2019. V. 39. P. 573–594.
- Sokolov A.Y., Lyubashina O.A., Pantelev S.S. // *Neurochem. J.* 2011. V. 5. P. 92–99.
- Sokolov A.Y., Lyubashina O.A., Amelin A.V., Pantelev S.S. // *Neurochem. J.* 2014. V. 8. P. 89–102.
- Sokolov A.Y., Lyubashina O.A., Amelin A.V., Pantelev S.S. // *Neurochem. J.* 2013. V. 7. P. 256–265.
- Sokolov A.Y., Murzina A.A., Osipchuk A.V., Lyubashina O.A., Amelin A.V. // *Neurochem. J.* 2017. V. 11. P. 194–212.
- Sokolov A.Y., Popova N.S., Povarenkov A.S., Amelin A.V. // *Neurochem. J.* 2018. V. 12. P. 324–336.
- Iyengar S., Johnson K.W., Ossipov M.H., Aurora S.K. // *Headache*. 2019. V. 59. P. 659–681.
- Wang X., Chen Y., Song J., You C. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 649143.
- Moreno-Ajona D., Pérez-Rodríguez A., Goadsby P.J. // *Curr. Opin. Neurol.* 2020. V. 33. P. 309–315.
- Ha D.K., Kim M.J., Han N., Kwak J.H., Baek I.H. // *Clin. Drug Investig.* 2021. V. 41. P. 119–132.
- Miyata A., Arimura A., Dahl R.R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M.D., Coy D.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V. 164. P. 567–574.
- Hirabayashi T., Nakamachi T., Shioda S. // *J. Headache Pain*. 2018. V. 19. P. 28.
- Mutt V., Said S.I. // *Eur. J. Biochem.* 1974. V. 42. P. 581–589.
- Edvinsson L., Tajti J., Szalárdy L., Vécsei L. // *J. Headache Pain*. 2018. V. 19. P. 21.
- Sundrum T., Walker C.S. // *Br J. Pharmacol.* 2018. V. 175. P. 4109–4120.
- Rubio-Beltrán E., Correnti E., Deen M., Kamm K., Kelderman T., Papetti L., Vigneri S., Maassen Van Den Brink A., Edvinsson L.; European Headache Federation School of Advanced Studies (EHF-SAS) // *J. Headache Pain*. 2018. V. 19. P. 64.
- Fahrenkrug J., Goetzl E.J., Gozes I., Harmar A., Laburthe M., May V., Pisegna J.R., Said S.I., Vaudry H., Vaudry D., Waschek J.A. // *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*. 2019. № 4. Available from: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F67/2019.4>
- Liao C., de Molliens M.P., Schreebeli S.T., Brewer M., Song G., Chatenet D., Braas K.M., May V., Li J. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2019. V. 19. P. 1399–1417.
- Holland P.R., Barloese M., Fahrénkrug J. // *J. Headache Pain*. 2018. V. 19. P. 20.
- Waschek J.A., Baca S.M., Akerman S. // *J. Headache Pain*. 2018. V. 19. P. 23.
- Denes V., Geck P., Mester A., Gabriel R. // *J. Clin. Med.* 2019. V. 8. P. 1488.
- Rustichelli C., Lo Castro F., Baraldi C., Ferrari A. // *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 2020. V. 29. P. 1269–1275.

33. Toth D., Szabo E., Tamas A., Juhasz T., Horvath G., Fabian E., Oppen B., Szabo D., Maugeri G., D'Amico A.G., D'Agata V., Vicena V., Reglodi D. // *Front. Endocrinol.* (Lausanne). 2020. V. 11. P. 377.
34. Moody T.W., Jensen R.T. // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2021. V. 28. P. 198–205.
35. Moody T.W., Jensen R.T. // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2021. V. 28. P. 206–213.
36. Vollesen A.L.H., Amin F.M., Ashina M. // *Neurotherapeutics*. 2018. V. 15. P. 371–376.
37. Warfvinge K., Edvinsson L. // *Cephalalgia*. 2020. V. 40. P. 527–542.
38. Tuka B., Helyes Z., Markovics A., Bagoly T., Szolcsányi J., Szabó N., Tóth E., Kincses Z.T., Vécsei L., Tajti J. // *Cephalalgia*. 2013. V. 33. P. 1085–1095.
39. Zagami A.S., Edvinsson L., Goadsby P.J. // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2014. V. 1. P. 1036–1040.
40. Hansen J.M., Fahrenkrug J., Petersen J., Wienecke T., Olsen K.S., Ashina M. // *Scand. J. Pain*. 2013. V. 4. P. 211–216.
41. Tuka B., Szabó N., Tóth E., Kincses Z.T., Párdutz Á., Szok D., Körtési T., Bagoly T., Helyes Z., Edvinsson L., Vécsei L., Tajti J. // *J. Headache Pain*. 2016. V. 17. P. 69.
42. Veréb D., Szabó N., Tuka B., Tajti J., Király A., Faragó P., Kocsis K., Tóth E., Kincses B., Bagoly T., Helyes Z., Vécsei L., Kincses Z.T. // *Neurology*. 2018. V. 91. E. 1166–1174.
43. Pérez-Pereda S., Toriello-Suárez M., Ocejo-Vinyals G., Guiral-Foz S., Castillo-Obeso J., Montes-Gómez S., Martínez-Nieto R.M., Iglesias F., González-Quintanilla V., Oterino A. // *Mol. Biol. Rep.* 2020. V. 47. P. 7125–7138.
44. Han X., Dong Z., Hou L., Wan D., Chen M., Tang W., Yu S. // *Clin. Chim. Acta*. 2015. V. 450. P. 151–154.
45. Cernuda-Morollón E., Riesco N., Martínez-Camblor P., Serrano-Pertierra E., García-Cabo C., Pascual J. // *Headache*. 2016. V. 56. P. 1448–1454.
46. Cernuda-Morollón E., Martínez-Camblor P., Alvarez R., Larrosa D., Ramón C., Pascual J. // *Cephalalgia*. 2015. V. 35. P. 310–316.
47. Hanci F., Kilinc Y.B., Kilinc E., Turay S., Dilek M., Kabakus N. // *Cephalalgia*. 2021. V. 41. P. 166–175.
48. Hoffmann J., Miller S., Martins-Oliveira M., Akerman S., Suprongsinchai W., Sun H., Shi L., Wang J., Zhu D., Lehto S., Liu H., Yin R., Moyer B.D., Xu C., Goadsby P.J. // *Pain*. 2020. V. 161. P. 1670–1681.
49. Riesco N., Cernuda-Morollón E., Martínez-Camblor P., Pérez-Alvarez A.I., Verano L., García-Cabo C., Serrano-Pertierra E., Pascual J. // *Cephalalgia*. 2017. V. 37. P. 823–827.
50. Wei D.Y., Goadsby P.J. // *Nat. Rev. Neurol.* 2021. V. 17. P. 308–324.
51. Edvinsson L., Uddman R. // *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 2005. V. 48. P. 438–456.
52. Bellamy J.L., Cady R.K., Durham P.L. // *Headache*. 2006. V. 46. P. 24–33.
53. Cernuda-Morollón E., Martínez-Camblor P., Ramón C., Larrosa D., Serrano-Pertierra E., Pascual J. // *Headache*. 2014. V. 54. P. 987–995.
54. Demartini C., Greco R., Zanaboni A.M., Sances G., De Icco R., Borsook D., Tassorelli C. // *Prog. Neurobiol.* 2019. V. 177. P. 15–32.
55. Körtési T., Tuka B., Nyári A., Vécsei L., Tajti J. // *J. Headache Pain*. 2019. V. 20. P. 43.
56. Han X., Ran Y., Su M., Liu Y., Tang W., Dong Z., Yu S. // *Mol. Pain*. 2017. V. 13. 1744806917720361.
57. Zhang Q., Han X., Wu H., Zhang M., Hu G., Dong Z., Yu S. // *Mol. Pain*. 2019. V. 15. 1744806918820452.
58. Schytz H.W., Birk S., Wienecke T., Kruuse C., Olesen J., Ashina M. // *Brain*. 2009. V. 132. P. 16–25.
59. Amin F.M., Hougaard A., Schytz H.W., Asghar M.S., Lundholm E., Parvaiz A.I., de Koning P.J., Andersen M.R., Larsson H.B., Fahrenkrug J., Olesen J., Ashina M. // *Brain*. 2014. V. 137. P. 779–794.
60. Ashina H., Schytz H.W., Ashina M. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2019. V. 255. P. 109–120.
61. Guo S., Vollesen A.L., Hansen Y.B., Frandsen E., Andersen M.R., Amin F.M., Fahrenkrug J., Olesen J., Ashina M. // *Cephalalgia*. 2017. V. 37. P. 136–147.
62. Guo S., Vollesen A.L.H., Olesen J., Ashina M. // *Pain*. 2016. V. 157. P. 2773–2781.
63. Wienholtz N.K.F., Christensen C.E., Zhang D.G., Coskun H., Ghanizada H., Al-Karaghali M.A., Hannibal J., Egeberg A., Thyssen J.P., Ashina M. // *Cephalalgia*. 2021. V. 41. P. 731–748.
64. Ashina H., Guo S., Vollesen A.L.H., Ashina M. // *J. Headache Pain*. 2017. V. 18. P. 110.
65. Ghanizada H., Al-Karaghali M.A., Arngnim N., Ghanizada M., Larsson H.B.W., Amin F.M., Ashina M. // *Peptides*. 2019. V. 121. 170134.
66. Ghanizada H., Al-Karaghali M.A., Arngnim N., Olesen J., Ashina M. // *Cephalalgia*. 2020. V. 40. P. 57–67.
67. Amin F.M., Schytz H.W. // *J. Headache Pain*. 2018. V. 19. P. 35.
68. Rahmann A., Wienecke T., Hansen J.M., Fahrenkrug J., Olesen J., Ashina M. // *Cephalalgia*. 2008. V. 28. P. 226–236.
69. Hansen J.M., Sitarz J., Birk S., Rahmann A.M., Oturai P.S., Fahrenkrug J., Olesen J., Ashina M. // *Cephalalgia*. 2006. V. 26. P. 992–1003.
70. Pellesi L., Al-Karaghali M.A., Chaudhry B.A., Lopez C.L., Snellman J., Hannibal J., Amin F.M., Ashina M. // *Cephalalgia*. 2020. V. 40. P. 1212–1223.
71. Boni L.J., Ploug K.B., Olesen J., Jansen-Olesen I., Gupta S. // *Cephalalgia*. 2009. V. 29. P. 837–847.
72. Syed A.U., Koide M., Braas K.M., May V., Wellman G.C. // *J. Mol. Neurosci.* 2012. V. 48. P. 574–583.
73. Akerman S., Goadsby P.J. // *Sci Transl Med*. 2015. V. 7. 308ra157.
74. Jansen-Olesen I., Hougaard Pedersen S. // *J. Headache Pain*. 2018. V. 19. P. 16.
75. Bhatt D.K., Gupta S., Olesen J., Jansen-Olesen I. // *Cephalalgia*. 2014. V. 34. P. 877–886.
76. Baun M., Pedersen M.H., Olesen J., Jansen-Olesen I. // *Cephalalgia*. 2012. V. 32. P. 337–345.
77. Pedersen S.H., la Cour S.H., Calloe K., Hauser F., Olesen J., Klaerke D.A., Jansen-Olesen I. // *Front. Cell. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 114.
78. Okragly A.J., Morin S.M., DeRosa D., Martin A.P., Johnson K.W., Johnson M.P., Benschop R.J. // *Cephalalgia*. 2018. V. 38. P. 1564–1574.
79. Vollesen L.H., Guo S., Andersen M.R., Ashina M. // *Cephalalgia*. 2019. V. 39. P. 597–607.
80. Wienholtz N.K.F., Christensen C.E., Coskun H., Zhang D.G., Ghanizada H., Egeberg A., Thyssen J.P., Ashina M. // *J. Invest. Dermatol.* 2021. V. 141. P. 1687–1698.
81. Birk S., Sitarz J.T., Petersen K.A., Oturai P.S., Kruuse C., Fahrenkrug J., Olesen J. // *Regul. Pept.* 2007. V. 140. P. 185–191.

82. Amin F.M., Asghar M.S., Guo S., Hougaard A., Hansen A.E., Schytz H.W., van der Geest R.J., de Koning P.J., Larsson H.B., Olesen J., Ashina M. // *Cephalalgia*. 2012. V. 32. P. 140–149.
83. Reglodi D., Vaczy A., Rubio-Beltran E., MaassenVanDenBrink A. // *J. Headache Pain*. 2018. V. 19. P. 19.
84. Schytz H.W., Holst H., Arendt-Nielsen L., Olesen J., Ashina M. // *J. Headache Pain*. 2010. V. 11. P. 309–316.
85. Sándor K., Bölcskei K., McDougall J.J., Schuelert N., Reglodi D., Elekes K., Petho G., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Z. // *Pain*. 2009. V. 141. P. 143–150.
86. Jongsma H., Pettersson L.M., Zhang Yz., Reimer M.K., Kanje M., Waldenström A., Sundler F., Danielsen N. // *Neuroreport*. 2001. V. 12. P. 2215–2219.
87. Davis-Taber R., Baker S., Lehto S.G., Zhong C., Surowy C.S., Faltynek C.R., Scott V.E., Honore P. // *J. Pain*. 2008. V. 9. P. 449–456.
88. Sándor K., Kormos V., Botz B., Imreh A., Bölcskei K., Gaszner B., Markovics A., Szolcsányi J., Shintani N., Hashimoto H., Baba A., Reglodi D., Helyes Z. // *Neuropeptides*. 2010. V. 44. P. 363–371.
89. Shimizu T., Katahira M., Sugawara H., Inoue K., Miyata A. // *Regul. Pept*. 2004. V. 123. P. 117–122.
90. Schuelert N., McDougall J.J. // *Osteoarthritis Cartilage*. 2006. V. 14. P. 1155–1162.
91. Yeomans D.C., Onyükel H., Dagar S., Ikezaki H., Lu Y., Rubinstein I. // *Peptides*. 2003. V. 24. P. 617–622.
92. Shin M.S. // *Brain Res*. 2005. V. 1040. P. 197–201.
93. Markovics A., Kormos V., Gaszner B., Lashgarara A., Szoke E., Sandor K., Szabadfi K., Tuka B., Tajti J., Szolcsányi J., Pinter E., Hashimoto H., Kun J., Reglodi D., Helyes Z. // *Neurobiol. Dis*. 2012. V. 45. P. 633–644.
94. Mason B.N., Kaiser E.A., Kuburas A., Loomis M.M., Latham J.A., Garcia-Martinez L.F., Russo A.F. // *J. Neurosci*. 2017. V. 37. P. 204–216.
95. Kuburas A., Mason B.N., Hing B., Wattiez A.S., Reis A.S., Sowers L.P., Moldovan Loomis C., Garcia-Martinez L.F., Russo A.F. // *J. Neurosci*. 2021. V. 41. P. 4697–4715.
96. Burstein R., Nosedo R., Fulton A.B. // *J. Neuroophthalmol*. 2019. V. 39. P. 94–102.
97. Jansen-Olesen I., Baun M., Amrutkar D.V., Ramachandran R., Christophersen D.V., Olesen J. // *Neuropeptides*. 2014. V. 48. P. 53–64.
98. Kilinc E., Firat T., Tore F., Kiyan A., Kukner A., Tunçel N. // *J. Neurosci. Res*. 2015. V. 93. P. 644–650.
99. De Logu F., Landini L., Janal M.N., Li Puma S., De Cesaris F., Geppetti P., Nassini R. // *J. Headache Pain*. 2019. V. 20. P. 18.
100. Ságghy É., Payrits M., Helyes Z., Reglodi D., Bánki E., Tóth G., Couvineau A., Szóke É. // *Neuroscience*. 2015. V. 308. P. 144–156.
101. Nosedo R., Schain A.J., Melo-Carrillo A., Tien J., Stratton J., Mai F., Strassman A.M., Burstein R. // *Cephalalgia*. 2020. V. 40. P. 229–240.
102. González-Hernández A., Marichal-Cancino B.A., Garcia-Boll E., Villalón C.M. // *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets*. 2020. V. 19. P. 344–359.
103. Edvinsson J.C.A., Grell A.S., Warfvinge K., Sheykhzade M., Edvinsson L., Haanes K.A. // *Cephalalgia*. 2020. V. 40. P. 1296–1309.
104. Moldovan Loomis C., Dutzar B., Ojala E.W., Hendrix L., Karasek C., Scalley-Kim M., Mulligan J., Fan P., Billgren J., Rubin V., Boshaw H., Kwon G., Marzolf S., Stewart E., Jurchen D., Pederson S.M., Perrino McCulloch L., Baker B., Cady R.K., Latham J.A., Allison D., Garcia-Martinez L.F. // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2019. V. 369. P. 26–36.
105. Ashina M., Doležil D., Bonner J.H., Zhou L., Klatt J., Picard H., Mikol D.D. // *Cephalalgia*. 2021. V. 41. P. 33–44.
106. Liao C., de Molliens M.P., Schneebeli S.T., Brewer M., Song G., Chatenet D., Braas K.M., May V., Li J. // *Curr. Top. Med. Chem*. 2019. V. 19. P. 1399–1417.

The Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Peptide in Migraine Pathogenesis

A. Y. Sokolov^{a, b}, A. V. Osipchuk^a, I. B. Skiba^{a, c}, and A. V. Amelin^d

^a Valdman Institute of Pharmacology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

^b Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

^c Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

^d Department of Neurology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

In this review, we summarize the experimental and clinical data supporting the role of the pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide in the pathophysiology of primary headaches, including migraine. We provide evidence of the involvement of these mediators and their receptors in the nociception and vascular tone regulation, especially within the trigeminovascular system. The anticephalalgic potential of pharmacological agents blocking PACAP-ergic pathway is also discussed.

Keywords: headache, migraine, trigeminal nerve, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), vasoactive intestinal peptide (VIP)

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

УДК 612.822.3

ГИПОТЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ТРЕМОРА ПОКОЯ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2022 г. И. Г. Силькис*

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

Поступила в редакцию 15.08.2021 г.

После доработки 09.09.2021 г.

Принята к публикации 06.10.2021 г.

Предложен гипотетический механизм появления тремора покоя при болезни Паркинсона. В основе этого тремора лежит вызванная дефицитом дофамина модификация эффективности возбудительных входов к шипиковым клеткам стриатума, которая приводит к реорганизации активности в нейронной сети, включающей новую кору, таламус, базальные ганглии, мозжечок, субталамическое и педункулопонтинное ядра. В результате этой модификации снижается активность стрионигральных клеток, ведущая к растормаживанию нейронов внутренней части бледного шара. Одновременно увеличивается активность стриопаллидарных клеток, что усиливает ингибирование нейронов наружной части бледного шара и приводит к снижению их активности и уменьшению их ингибирующего действия на нейроны внутренней части бледного шара, а также субталамического ядра и новой коры. В результате активность нейронов этих структур возрастает. Усиление ГАМКергического входа из внутренней части бледного шара к нейронам субталамического ядра, приводящее к гиперполяризации мембраны нейронов, способствует генерации ими пачечных разрядов с частотой тремора. Увеличение активности нейронов субталамического ядра приводит к усилению возбуждения их клеток-мишеней в педункулопонтинном ядре и глубоких ядрах мозжечка. Последующее усиление возбуждающего действия мозжечка на нейроны таламуса передается в новую кору и стриатум. Согласно предлагаемому механизму, степень возбуждения нейронов субталамического ядра определяет амплитуду тремора и позволяет объяснить тот факт, что увеличение активности в мозжечке, таламусе и коре коррелирует с выраженностью тремора. Из предлагаемого механизма следует, что поскольку избирательные агонисты дофаминовых D2 рецепторов и/или антагонисты аденозиновых A2A рецепторов должны способствовать индукции длительной депрессии на стриопаллидарных клетках, ослаблению их ингибирующего действия на нейроны наружной части бледного шара и последующему усилению торможения субталамического ядра, эти вещества можно использовать для подавления тремора покоя. Эти следствия гипотезы имеют экспериментальное подтверждение.

Ключевые слова: тремор покоя, синаптическая пластичность, базальные ганглии, мозжечок, таламус, субталамическое ядро

DOI: 10.31857/S1027813322010113

ВВЕДЕНИЕ

Одним из часто наблюдаемых симптомов болезни Паркинсона (БП) является тремор покоя, характеризующийся частотой 4–6 Гц [1]. На основании клинических данных о том, что дофамин по-разному влияет на тремор покоя и такие симп-

томы БП, как дискинезия и ригидность, было предположено, что механизмы, лежащие в их основе, отличаются [2]. Брадикинезию и ригидность объясняют снижением уровня дофамина во входной структуре базальных ганглиев (БГ) — стриатуме, тогда как тремор покоя связывают с взаимодействием БГ с цепью мозжечок—тала-

Принятые сокращения: БГ — базальные ганглии; БП — болезнь Паркинсона; БШв — внутренняя часть бледного шара; БШн — наружная часть бледного шара; ВЛ — вентролатеральное таламическое ядро; ВЛп — задняя часть ядра ВЛ; ВПЯ — вентральное промежуточное таламическое ядро; ВЧС — высокочастотная стимуляция; ДП — длительная потенция эффективности возбудительного синаптического входа; ДД — длительная депрессия эффективности возбудительного синаптического входа; ГЯМ — глубокие ядра мозжечка; К—БГ—Т—К — нейронная сеть кора—базальные ганглии—таламус—кора; КП — клетки Пуркинье; КЯ — красное ядро; М—Т—К — цепь мозжечок—таламус—кора; ППЯ — педункулопонтинное ядро; ПФЯ — парафасцикулярное таламическое ядро; С—Н — стрионигральные клетки; С—П — стриопаллидарные клетки; СТЯ — субталамическое ядро; ЧВк — компактная часть черного вещества; ЧВр — ретикулярная часть черного вещества; ЭПЯ — энтопедункулярное ядро; ЯМ — ядра моста.

* Адресат для корреспонденции: 117865 Москва, ул. Бутлерова, д. 5а; тел.: +7 495-789-3852, e-mail: isa-silkis@mail.ru.

мус—кора (М—Т—К) и увеличением активности нейронов в этой цепи, которое зависит от изменений дофаминергических проекций к этим нейронам [2, 3]. Согласно модели, названной переключатель “диммер”, активность, вызывающая тремор при БП, возникает во внутренней части бледного шара (БШв) — одной из выходных структур БГ и затем распространяется в цепь М—Т—К, где ритмическая активность тремора поддерживается и усиливается [2, 4, 5]. При этом нейронная активность в новой коре, которую е связывают с амплитудой тремора, влияет на активность всей сети через БГ [5]. Имеются данные и о значительной роли изменений активности нейронов наружной части бледного шара (БШн) в появлении симптомов БП [6]. Поскольку в таламус проецируются преимущественно ГАМКергические клетки выходных ядер БГ — БШв и ретикулярной части черного вещества (ЧВр) [7], увеличение активности нейронов БШв при треморе должно приводить к усилению ингибирования нейронов таламуса. Однако, поскольку при треморе покоя наблюдается увеличение активности в цепи М—Т—К, есть основания полагать, что существует некий механизм, обеспечивающий такое возбуждение нейронов таламуса, которое компенсирует его ингибирование со стороны БГ.

Поскольку у пациентов с БП тремор покоя наблюдается вследствие гибели дофаминергических клеток компактной части черного вещества (ЧВк) и ретро-рубальной области [8, 9] и поскольку плотность чувствительных к дофамину D1 и D2 рецепторов самая большая во входной структуре БГ — стриатуме, естественно предположить, что тремор связан с изменением функционирования нейронов стриатума и последующим изменением активности их клеток-мишеней в БШв и БШн (рис. 1). В свою очередь, это приведет к реорганизации активности в структурах, на которые проецируются БШв и БШн. Отмечено, что у пациентов с тремором покоя меняется паттерн разрядов нейронов разных ядер БГ. В них активность соседних нейронов становится более синхронизированной и появляются связанные с тремором пачечные разряды [6, 10]. Такую активность регистрировали в БШ, субталамическом ядре (СТЯ), педункулопонтинном ядре (ППЯ), таламических ядрах [11–16]. При моделировании БП у грызунов и приматов пачечную активность наблюдали и у шипиковых клеток стриатума [17]. Все упомянутые структуры взаимосвязаны, поэтому приведенные экспериментальные данные указывают на распространение осцилляторной активности по всей сети.

Целью настоящей работы являлся анализ возможных механизмов, лежащих в основе появления пачечной активности, а также увеличения ак-

тивности нейронов в цепи М—Т—К при треморе покоя, вызванном дефицитом дофамина. При решении поставленной задачи использованы результаты проведенного ранее анализа возможных механизмов влияния дофамина на функционирование нейронной сети, включающей новую кору, БГ, таламус, мозжечок, СТЯ и ППЯ [18].

ГЕНЕРАЦИЯ СИНХРОНИЗИРОВАННОЙ ПАЧЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ В РАЗНЫХ СТРУКТУРАХ ПРИ ТРЕМОРЕ ПОКОЯ

Во введении отмечено, что у пациентов с БП при треморе покоя активность в разных структурах возрастает, появляются пачечные разряды с частотой тремора, а также изменяются связи между структурами. В частности, увеличивается активность нейронов в мозжечке и усиливаются связи зубчатого ядра мозжечка с вентральным промежуточным ядром таламуса (ВПЯ), а также связи ВПЯ с первичной моторной корой М1, премоторной корой, дополнительной моторной областью и бледным шаром [19]. При этом сила связи ВПЯ с зубчатым ядром мозжечка и полем М1 положительно коррелировала только с выраженностью тремора, но не акинезии или ригидности [16, 19]. Активность нейронов в некоторых ядрах БГ была когерентна с тремором покоя [20]. У пациентов с тремором выявлено увеличение активности в бледном шаре по сравнению с пациентами, у которых тремора не было [21]. Только при треморе покоя ритмическую активность, которая значимо не отличалась от частоты тремора 4.4 Гц, наблюдали у 19.7% нейронов бледного шара [14]. Активность с частотой тремора наблюдали не только у 15.4% клеток БШв, но и у 46.8% клеток вентрального орального заднего таламического ядра, в которое проецируется БШв, а также у клеток таламического ядра ВПЯ, в которое поступает иннервация из глубоких ядер мозжечка (ГЯМ) [11]. В парафасцикулярном ядре (ПФЯ) и вентролатеральном (ВЛ) ядре таламуса также наблюдали ритмическую пачечную активность, тогда как при произвольных движениях или в ответах на соматосенсорные стимулы этот эффект отсутствовал [14].

При повреждении ЧВк возрастала частота срабатывания нейронов ППЯ и ВЛ, а паттерн срабатывания нейронов ППЯ становился пачечным [13]. При БП пачечные разряды наблюдали примерно у 21% клеток ППЯ [15]. При треморе у пациентов с БП увеличивалась функциональная связь между скорлупой стриатума и мозжечком [22], а также возрастала активность в цепи М—Т—К [23]. Кроме того, была выявлена синхронизация активности между парами нейронов в БШв, ЧВр

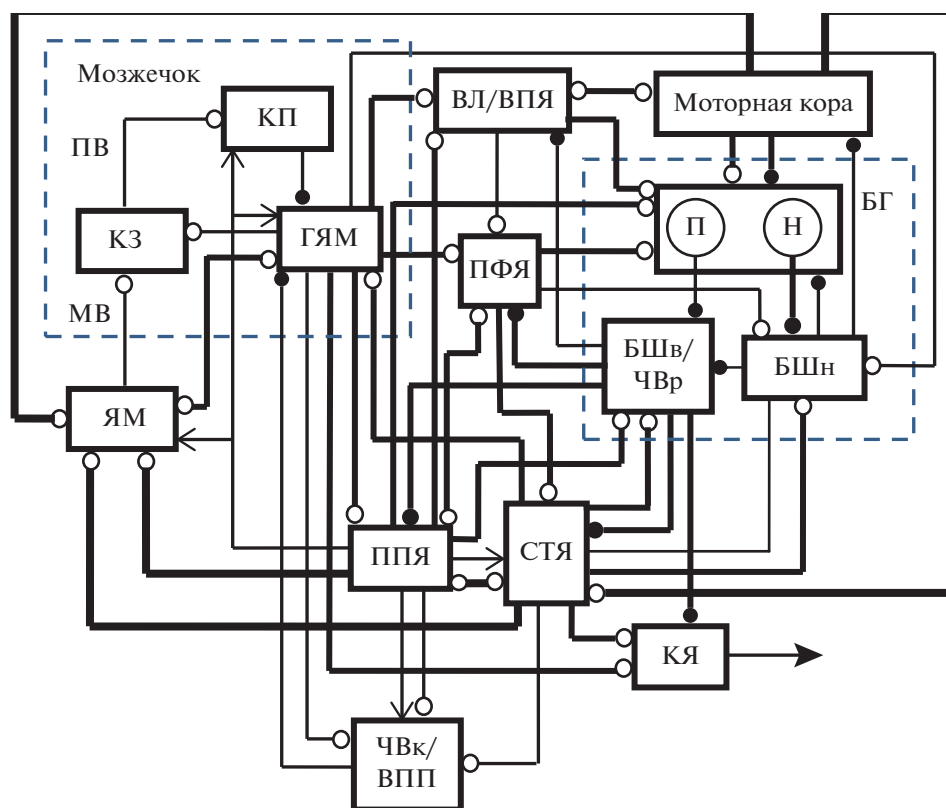


Рис. 1. Упрощенная схема организации взаимодействий в нейронной сети, участвующей в генерации тремора покоя в условиях дефицита дофамина. П — стрионигральные клетки, дающие начало прямому пути через базальные ганглии; Н — стриопаллидарные клетки, дающие начало непрямому пути через базальные ганглии. КЗ — клетки-зерна; КП — клетки Пуркинье; ГЯМ — глубокие ядра мозжечка; МВ — мшистые волокна; ПВ — параллельные волокна; БГ — базальные ганглии; БШН — наружная часть бледного шара; БШВ — внутренняя часть бледного шара; ЧВр и ЧВк — ретикулярная и компактная части черного вещества, соответственно; ВПП — вентральное поле покрышки; ЯМ — ядра моста; СТЯ — субталамическое ядро; ППЯ — педункулопонтинное ядро; ПФЯ, ВПЯ, ВЛ — парафасцикулярное, вентральное промежуточное, вентролатеральное ядра таламуса, соответственно; КЯ — красное ядро. Линии, оканчивающиеся белыми и черными кружками — возбуждающие и тормозные связи, соответственно. Мозжечок и базальные ганглии ограничены пунктирными прямоугольниками. Утолщенные и тонкие линии — потенцированные и депрессированные взаимодействия, соответственно, в условиях дефицита дофамина.

и БШН, причем осцилляции имели частоту тремора [24]. У приматов с тремором покоя также заметно усиливалась корреляция активности между удаленно расположенными нейронами бледного шара по сравнению со здоровыми приматами [25, 26]. У пациентов с БП только при треморе покоя, но не при брадикинезии или регидности, в активности нейронов СТЯ наблюдали осцилляции с частотой 4–6 Гц [12]. Существенное увеличение числа пачечных разрядов в активности нейронов СТЯ при дефиците дофамина показано и в работе [27]. По сравнению со здоровыми испытуемыми, при БП увеличивается функциональная связь СТЯ с первичной моторной корой М1, а также с первичной сенсорной корой и дополнительной моторной корой [28]. Эти данные позволили предположить, что СТЯ играет важную роль в изменении функционирования цепи, связывающей БГ с моторной корой при БП [28].

ОСОБЕННОСТИ МЕЖНЕЙРОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СЕТИ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ СТРУКТУРЫ, В КОТОРЫХ ПРИ ТРЕМОРЕ ПОКОЯ НАБЛЮДАЕТСЯ РИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Упомянутые выше такие структуры как новая кора, таламус, БГ, мозжечок, СТЯ и ППЯ, в которых при БП генерируется активность с частотой тремора покоя, взаимосвязаны и образуют сеть, которая схематически представлена на рис. 1. Особенности функциональной организации нейронной сети кора–базальные ганглии–таламус–кора (К–БГ–Т–К) подробно описаны нами ранее [29, 30]. Кроме возбуждающих входов в стриатум из новой коры и таламуса, недавно выявленные прямые входы из новой коры и из зубчатого ядра мозжечка в выходные структуры БГ — БШВ и ЧВр. Эта прямая иннервация поступает в основном из сенсомоторных областей коры и мозжечка [31]. Возбуждение из моторной и первичных сен-

сорных областей коры поступает к входным клеткам-зернам коры мозжечка, а также к нейронам ГЯМ через ядра моста (ЯМ) [32–34]. Возбуждение из ГЯМ возвращается в ЯМ, где оно конвергирует с входами из неокортекса. Сигналы из ГЯМ поступают в неокортекс через таламус [35]. Кроме того, нейроны ГЯМ дисинаптически (через таламус) возбуждают шипиковые клетки стриатума [36]. Также нейроны ГЯМ проецируются в БШн [37]. Проекция из зубчатого ядра мозжечка через таламус в скорлупу стриатума, а также в БШн организованы топографически [37]. Возбуждение к нейронам ЯМ поступает также из СТЯ и ППЯ, находящихся под тормозным контролем со стороны выходных ядер БГ [35], причем такая организация характерна и для человека [38]. Нейроны ГЯМ могут влиять на разные структуры и через ПФЯ таламуса, в которое проецируются нейроны выходных ядер БГ, БШ, а также ВЛ [39] и которое моносинаптически возбуждают нейроны БШн/БШ [40], а также стриатум и СТЯ [41, 42]. Поэтому ГЯМ может влиять на функционирование СТЯ как через БГ, так и через ПФЯ [43]. Нейроны СТЯ обеспечивают основной возбудительный вход к нейронам выходных ядер БГ (ЧВр и БШв/ЭПЯ), а также к нейронам БШн/БШ, причем СТЯ иннервирует те же нейроны ЧВр и БШв/ЭПЯ, которые проецируются в таламус [44, 45]. СТЯ и ППЯ реципрокно возбуждают друг друга [46]. Стимуляция СТЯ и ЧВр вызвала в нейронах ППЯ возбудительные и тормозные ответы, соответственно [47]. Поскольку СТЯ возбуждает нейроны выходных ядер БГ, оно модулирует активность нейронов ППЯ не только за счет прямого возбуждения, но и вследствие ингибирования со стороны БГ [48]. В ППЯ поступает возбуждение также из ПФЯ таламуса [49] и новой коры [50]. Нейроны ППЯ иннервируют выходные ядра БГ и вентральный таламус [51], а также таламо-стриатные клетки [52], моторные зоны ствола мозга и спинного мозга [50].

Следует отметить, что таламо-стриатные входы, так же как входы от дофаминергических клеток, нейронов ППЯ, сенсорных и лимбических областей коры, одинаковы для стрионигральных (С-Н) и стриопаллидарных (С-П) клеток, дающих начало прямому и не прямому пути через БГ [53, 54], в отличие от моторной коры, которая иннервирует преимущественно нейроны непрямого пути [55]. Новая кора возбуждает нейроны СТЯ по гиперпрямому пути, так что при стимуляции коры реакции нейронов СТЯ предшествует возбуждению нейронов бледного шара [56]. Следует отметить, что входы из первичной моторной коры в СТЯ организованы соматотопически [44] и что в сенсомоторной части СТЯ выявлена карта тела [57]. Входы из ПФЯ в СТЯ также топографически организованы [42]. Топографическая орга-

низации и замкнутость является важным свойством цепей К–БГ–Т–К и М–Т–К–М [35].

Известно, что ППЯ состоит из нейронов разных типов, содержащих ацетилхолин, ГАМК или глутамат [58]. Холинергические нейроны ППЯ иннервируют практически все таламические ядра [58] и мозжечок, где ацетилхолин действует как на мускариновые, так и никотиновые рецепторы [59]. Поскольку показано, что аппликация антагониста холинорецепторов уменьшала ответы нейронов ЯМ [60], можно полагать, что действие ацетилхолина на ЯМ является потенцирующим. На КП имеются мускариновые М3 рецепторы, а их активация способствует индукции длительной потенциации (ДП) в пути параллельные волокна–КП [61]. С учетом правил модификации для нейронов ГЯМ [18], увеличение активности КП должно способствовать увеличению эффективности возбуждения нейронов ГЯМ. Эти данные позволяют полагать, что холинергическое влияние со стороны ППЯ на ГЯМ также является потенцирующим.

С целью упрощения на рис. 1 не представлены интернейроны, которые имеются в каждой из структур, отображены не все длинноаксонные ГАМКергические клетки, проецирующиеся в другие структуры. К длинноаксонным можно отнести С-Н и С-П шипиковые клетки, иннервирующие соответственно нейроны БШв/ЧВр и БШн; нейроны БШв /ЧВр, проецирующиеся на нейроны таламуса, СТЯ и ППЯ; а также нейроны БШн, ингибирующие СТЯ и БШв/ЧВр (рис. 1). Кроме того, нейроны БШн оказывают тормозное влияние на шипиковые нейроны стриатума [62, 63] и на новую кору, где их аксоны оканчиваются на возбудительных и тормозных клетках [64]. Поскольку БШн находится под тормозным контролем со стороны стриатума [64] (рис. 1), этот вход в кору должен зависеть от функционирования стриатума. В моторной коре также обнаружены длинноаксонные тормозные нейроны, которые моносинаптически иннервируют С-Н и С-П нейроны дорзального стриатума [54]. Поскольку показано, что латентные периоды возбудительных ответов С-Н и С-П клеток на стимуляцию коры одинаковы [65], можно полагать, что кортико-стриатное торможение также поступает на оба типа шипиковых клеток одновременно.

На вовлеченность красного ядра (КЯ) в возникновение тремора указывают результаты работы [66], показавшие, что электрическая стимуляция КЯ может вызвать тремор конечностей. Это ядро получает активацию из ГЯМ и иннервирует мотонейроны, а также премоторные нейроны в стволе мозга и спинном мозге. Те части КЯ, в которые проецируются выходные ядра БГ, также получают иннервацию из ГЯМ – зубчатого ядра и латеральной части ядра интерпозитус [67].

С помощью теоретического моделирования показано, что в нейронной сети с взаимосвязанными тормозными клетками при наличии достаточно сильного возбуждения могут возникать осцилляции, частота которых зависит от силы торможения, а амплитуда (мощность) — от величины возбуждения [68]. Нейронная сеть, представленная на рис. 1, удовлетворяет этим требованиям. В возникновении ритмической активности в сети могут участвовать как длинноаксонные ГАМКергические клетки, так и тормозные интернейроны.

ВЫЗВАННЫЕ ДЕФИЦИТОМ ДОФАМИНА ИЗМЕНЕНИЯ МЕЖНЕЙРОННЫХ СВЯЗЕЙ В СЕТИ, УЧАСТВУЮЩЕЙ В ПОЯВЛЕНИИ ТРЕМОРА ПОКОЯ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

В норме в нейронной сети происходит постоянное изменение соотношений между возбуждением и торможением, однако даже небольшой сдвиг в этих соотношениях может привести к чрезмерной синхронизации нейронных разрядов [69]. Очевидно, что БГ должны играть важную роль в таких изменениях, поскольку под действием дофамина или в его отсутствие меняется эффективность тормозного действия со стороны ГАМКергических клеток выходных ядер БГ — ЧВр и БШв (аналогом которого у грызунов является ЭПЯ) на их клетки-мишени в таламусе, СТЯ, ППЯ и ЯМ. Эти ГАМКергические клетки, в свою очередь, находятся под влиянием торможения со стороны С-Н клеток, тогда как С-П клетки контролируют активность нейронов БШн, мишенями которого являются СТЯ, стриатум и новая кора (рис. 1). Активность С-Н и С-П шипиковых клеток существенно зависит от дофамина, так как плотность дофаминовых рецепторов в стриатуме самая высокая в мозге. С учетом данных о том, что на С-Н клетках преимущественно располагаются Д1 рецепторы, а на С-П — Д2 рецепторы, из предложенного нами ранее механизма влияния дофамина на функционирование нейронной сети, включающей кору, БГ и таламус, следует, что поскольку активация Д1 рецепторов на С-Н клетках способствует индукции ДП на их возбудительных входах, при выделении дофамина в стриатуме активность С-Н нейронов должна возрасти, что приведет к усилению торможения их клеток-мишеней в ЧВр и БШв/ЭПЯ [29]. Одновременная активация Д2 рецепторов на С-П клетках, способствующая индукции длительной депрессии (ДД) на их возбудительных входах, должна привести к уменьшению активности С-П клеток и ослаблению их ингибирующего действия на нейроны БШн. В результате усилятся тормозное действие со стороны нейронов БШн на их клетки-мишени в БШв/ЭПЯ, ЧВр, а также в СТЯ и новой коре (рис. 1). Последующее снижение активности нейронов СТЯ должно при-

водить к уменьшению возбуждения нейронов БШв, ЧВр, а также ППЯ и ГЯМ.

В согласии с этими следствиями предложенного механизма показано, что агонист Д2-рецепторов уменьшает выброс ГАМК в БШ (аналог БШн у грызунов) [70], а воздействие на Д1 рецепторы способствовало индукции ДД на входе СТЯ-ЧВр [71], т.е. снижало эффективность возбуждения нейронов ЧВр со стороны СТЯ. Этот эффект мог быть вызван воздействием на Д1 рецепторы на аксонных терминалах С-Н нейронов в ЧВр и увеличением выброса ГАМК.

При наличии тремора покоя у пациентов с БП потеря дофаминергических клеток наибольшая в медиальной части ЧВк (поле А9) и в ретро-рубальной области (поле А8), нейроны которых проецируются в матрикс дорсолатерального стриатума [9]. Поэтому, при БП на С-Н клетках не будет индуцироваться ДП, а на С-П — ДД [29]. Следовательно, активность нейронов БШв/ЧВр должна увеличиться в результате ослабления их ингибирования со стороны С-Н клеток, тогда как активность нейронов БШн должна снизиться, поскольку увеличится их ингибирование со стороны С-П клеток.

Именно такой характер изменений наблюдался в экспериментах в условиях дефицита дофамина или при использовании антагонистов дофаминовых рецепторов. Так, антагонист Д1-рецепторов уменьшал выброс ГАМК в ЭПЯ и ЧВр [72, 73], что должно способствовать увеличению активности нейронов в этих ядрах. У крыс с полным или почти полным повреждением ЧВк частота разрядов нейронов СТЯ значительно увеличивалась и в их активности появлялось больше пачечных разрядов, чем в норме [74]. В работе [75] также показано, что в условиях дефицита дофамина меняются тормозный вход из БШн в СТЯ и характер активности нейронов СТЯ. То, что частота срабатывания и паттерн активности нейронов СТЯ определяется возбуждением со стороны новой коры и торможением со стороны БШн, отмечено и в работе [76]. Тормозное влияние настолько сильное, что ингибирование нейронов БШн/БШ приводило к увеличению активности нейронов СТЯ на 358% и последующему значительному возбуждению нейронов ЧВр и БШв/ЭПЯ [77]. При повреждении дофаминергических клеток ЧВк увеличивается активность нейронов как в СТЯ, так и в ППЯ, ЧВр и БШв [46, 78]. Полагают, что этот эффект может быть вызван уменьшением тормозного влияния на нейроны СТЯ со стороны БШн [79]. Повреждение СТЯ ослабляло увеличение активности ППЯ и ЧВр, а повреждение ППЯ ослабляло увеличение активности СТЯ и ЧВр [46].

Появление “треморной” активности в БШв связывают с дегенерацией при БП дофаминергических клеток ретро-рубальной области, иннервирующих нейроны БШв [8]. На важную роль

этого входа указывает тот факт, что подавление nigro-паллидарного дофаминергического входа (т.е. входа из ЧВк) коррелирует с выраженностью тремора [3]. По мере прогрессирования БП тремор возрастает по амплитуде [80], т.е. выраженность тремора зависит от снижения концентрации дофамина. Дофамин может влиять на функционирование нейронов бледного шара за счет активации D1 рецепторов на аксонных терминалях С-Н нейронов в ЧВр и БШв/ЭПЯ, а также D2 рецепторов на аксонных терминалях С-П нейронов в БШн/БШ [81]. Активация D1 рецепторов должна приводить к увеличению выброса ГАМК, а активация D2 рецепторов — к уменьшению выброса ГАМК, ослаблению торможения и увеличению активности нейронов БШ/БШн. Действительно показано, что введение в БШ агониста (антагониста) D2-рецепторов приводит к увеличению (уменьшению) частоты срабатывания нейронов БШ [82].

Как уже указывалось, в БШв и ЧВр имеются и прямые возбуждающие входы из новой коры и из ГЯМ [31]. Поскольку в условиях дефицита дофамина С-Н клетки слабее ингибируют нейроны БШв и ЧВр, наличие прямых входов из коры и ГЯМ в дополнение к возбуждающему входу из СТЯ может только усилить активность нейронов БШв и ЧВр и увеличить ингибирование их клеток-мишеней в таламусе, СТЯ и ППЯ. Однако экспериментально наблюдалось увеличение частоты разрядов СТЯ и ППЯ [13]. По-видимому, эффект растормаживания СТЯ вследствие ослабления его торможения со стороны БШн превалирует над усилением его торможения со стороны БШн и ЧВр, а усиление возбуждения нейронов ППЯ со стороны СТЯ преобладает над усилением их ингибирования со стороны БШв и ЧВр. Это должно привести к увеличению активности нейронов ГЯМ и таламических ядер (в частности, ВЛ и ПФЯ) и связанных с ними нейронов новой коры. Поскольку при повреждении нейронов ЧВк активность ПФЯ таламуса возрастает [83] и поскольку повреждение ППЯ уменьшало этот эффект, можно полагать, что возбуждение ПФЯ сильно зависит от активности ППЯ. При этом надо учитывать то обстоятельство, что при БП нарушается и холинергический вход из ППЯ в таламус [84].

Естественно предположить, что усиление возбуждения нейронов СТЯ и ППЯ, которое приведет к увеличению возбуждения нейронов ЯМ и ГЯМ, должно усилить связи между СТЯ, ППЯ и мозжечком. Действительно, у пациентов с БП и тремором покоя СТЯ было сильнее связано с мозжечком, чем в норме или в отсутствие тремора, а сила этой связи положительно коррелировала с выраженностью тремора [85]. Как указывалось в наших предшествующих работах [18, 86], активность нейронов ГЯМ, возбуждающих тала-

мус, увеличивается при наличии торможения со стороны клеток Пуркиньи (КП). В связи с этим можно ожидать, что КП должны участвовать в появлении тремора. Действительно, на свободно подвижных мышах показано, что возникновение тремора коррелирует с увеличением ритмической активности КП, которая меняет активность нейронов ГЯМ [87].

Показано, что при треморе покоя усиливается активность в мозжечково-таламической цепи и что активность в этой цепи коррелирует с амплитудой тремора [3]. Эти данные указывают на то, что возбуждение нейронов таламических ядер со стороны ГЯМ превалирует над усилением их торможения со стороны БШв и ЧВр. Поскольку амплитуда осцилляций в сети связана с возбуждением, а частота зависит от эффективности торможения [68], можно ожидать, что степень возбуждения нейронов СТЯ и ППЯ будет играть существенную роль в выраженности тремора. Не исключено, что частота тремора зависит от активности в цепи, связывающей СТЯ, БШв и БШн. Это предположение базируется на данных о том, что у пациентов с БП только при треморе покоя в автокоррелограммах нейронов СТЯ появляется начальная пауза и в их наблюдаются осцилляции с частотой 4–6 Гц [12]. Наличие такой паузы указывает на вклад сильного возвратного торможения, которое должно гиперполяризовать мембрану. Если мембранный потенциал становится гиперполяризованным, активность нейронов СТЯ может переключаться с обычной спайковой на пачечную [27]. Цепь БШн–СТЯ не может обеспечить такой паузы, так как в условиях дефицита дофамина торможение нейронов СТЯ со стороны БШн слабее, чем в норме. Поскольку торможение БШв со стороны БШн также слабее, а возбуждение со стороны СТЯ сильнее, активность нейронов БШв должна быть большой, что усилит их тормозящее действие на нейроны СТЯ. Имеется, однако, и точка зрения, что цепь СТЯ–БШн представляет собой пейсмекер, активность в котором модулируется ингибированием нейронов БШн со стороны стриатума, причем при патологии в этой цепи усиливается синхронизированная осцилляторная активность [88].

Кроме того, дофамин может непосредственно влиять на активность нейронов таламуса и СТЯ, поскольку имеются полученные на приматах и человеке данные, что в таламус, включая заднюю часть вентролатерального ядра (ВЛп) и ПФЯ поступают дофаминергические афференты из ретро-рубальной области [39, 89–91], а в СТЯ оканчиваются дофаминергические афференты из ЧВк [92]. Не исключено, что пачечные разряды с частотой 4–6 Гц, возникающие при треморе в активности нейронов СТЯ [12], передаются их клеткам-мишеням в ППЯ и ГМЯ, а от них в таламус и новую кору. Показано, что уровень ГАМК в мо-

торной коре отрицательно коррелирует с выраженностью тремора при БП, а истощение ГАМК может увеличить выраженность моторных симптомов при БП [93]. Как уже указывалось, одним из источников ГАМК в коре является вход из БШн. Поскольку при дефиците дофамина активность ГАМКергических клеток в БШн уменьшена, по сравнению с нормой, это может являться одной из причин повышения активности нейронов моторной коры и увеличения выраженности тремора.

ГИПОТЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ТРЕМОРА ПОКОЯ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

С учетом вышеизложенного, нами выдвигается следующий гипотетический механизм возникновения тремора покоя при БП. В его основе лежат вызванные дефицитом дофамина изменения эффективности возбуждательных входов к ГАМКергическим шипиковым клеткам стриатума, лающим начало прямому и не прямому пути через БГ. Они приводят к снижению активности нейронов БШн, ослаблению его ингибирующего действия на нейроны СТЯ, последующему увеличению активности нейронов СТЯ и усилению возбуждения их клеток-мишеней в ППЯ и ГЯМ. В результате должна увеличиться активность нейронов таламуса, новой коры и КЯ, которые участвуют в проявлениях тремора. Уменьшение тормозного действия со стороны БШн на моторную кору также может увеличить ее активность. От степени возбуждения нейронов СТЯ, ППЯ и новой коры зависит амплитуда тремора. Частота тремора зависит от вызванных дефицитом дофамина изменений эффективности тормозных влияний в цепи, связывающей СТЯ, БШв и БШн, в результате которых в активности нейронов СТЯ появляются пачечные разряды с частотой 4–6 Гц.

Известно, что для цепей, включающих участки стриатума, СТЯ, БШ и ЧВр приматов характерна сомато-топическая организация. Она проявляется в том, что проекции из моторной коры, отображающие различные части тела, проецируются в различные области указанных ядер [92, 94]. При этом нейроны БГ отвечают не только на стимуляцию определенного участка моторной коры, но и на активные и пассивные движения этой части тела. По-видимому, вследствие этого, тремор затрагивает только одну часть тела, которая определяется высокой активностью определенной области коры. Отмечено, что в разных частях тела частота тремора может быть одинаковой, но может и отличаться, а также не быть синхронизированной по фазе. Эти данные указывают на то, что в нейронных цепях, относящихся к функционированию разных частей тела, создаются разные условия для генерации тремора [20].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА В ПОЛЬЗУ ВЫДВИГАЕМОЙ ГИПОТЕЗЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ТРЕМОРА ПОКОЯ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Если предлагаемый гипотетический механизм тремора покоя при БП верен, то введение в стриатум избирательного агониста D1 рецепторов должно препятствовать возникновению тремора за счет усиления ингибирования нейронов БШв; а введение в стриатум избирательного агониста D2 рецепторов должно подавить тремор или уменьшить его амплитуду за счет облегчения индукции ДД на С-П клетках, ослабления ингибирования нейронов БШн и увеличения их активности. С учетом того, что антагонисты A2A рецепторов должны приводить к такому же эффекту, что и агонисты D2 рецепторов, т.е. облегчать индукцию ДД на С-П клетках [29], их использование также должно уменьшать связанную с тремором активность в разных структурах и подавлять тремор покоя. В пользу этого предсказания предложенной гипотезы свидетельствуют данные о том, что для уменьшения тремора покоя, вызванного дефицитом дофамина, использовали антагонисты A2A рецепторов. В частности, антагонисты A2A рецепторов подавляли тремор лапы, вызванный антагонистом D2 рецепторов галоперидолом [95, 96]. Использование небольших доз леводопы в комбинации с антагонистом A2A рецепторов KW-6002 ослабляло тремор покоя [97]. Использование KW-6002 полезно еще и потому, что это вещество не вызывает дискинезии, в отличие от больших доз дофаминергических препаратов [98]. У некоторых пациентов с БП дофамин уменьшал связанную с тремором активность в таких структурах, как ВЛп и бледный шар, причем уменьшение активности нейронов ВЛп под действием дофамина коррелировало с клинической выраженностью подавления тремора [99]. Важно отметить, что этот эффект специфически относился к тремору и не был связан с такими симптомами БП, как дискинезия и ригидность [99].

Хотя леводопа может уменьшить вероятность возникновения тремора покоя при БП и его амплитуду [100], в некоторых случаях этот вид тремора был резистентен к дофаминергическим препаратам. Нельзя исключить, что в таких случаях дозы препаратов были недостаточны для воздействия на низко чувствительные D2 рецепторы. С нашей точки зрения, использование леводопы или неизбирательных антагонистов аденозиновых рецепторов вообще нежелательно, так как активация дофаминовых D1 рецепторов или инактивация аденозиновых A1 рецепторов должны способствовать индукции ДП на возбуждательных входах к нейронам коры, таламуса и СТЯ, что

приведет к увеличению их возбуждения [101] и будет препятствовать подавлению тремора.

Если, согласно предлагаемому механизму, СТЯ играет критическую роль в появлении тремора покоя, естественно ожидать, что подавление активности нейронов СТЯ будет препятствовать тремору. Действительно, для лечения тремора при БП используется высокочастотная стимуляция (ВЧС) СТЯ, приводящая к подавлению активности нейронов в этом ядре [102]. Существует точка зрения, что подавление тремора с помощью ВЧС разных структур связано не с возбуждением или ингибированием нейронов стимулируемой структуры, а с прерыванием аномального прохождения информации через эту структуру [103]. Это предположение представляется верным в том смысле, что подавление активности нейронов в одном из звеньев сети может прервать распространение аномальной активности во всей сети. Известные экспериментальные данные указывают именно на то, что тремор можно ослабить или устранить подавлением активности в разных звеньях сети, участвующей в появлении тремора. Для подавления тремора, резистентного к дофаминергическим препаратам, используют ВЧС ПФЯ таламуса [104] или ВПЯ таламуса, которое связывает зубчатое ядро мозжечка с первичной моторной областью коры [105]. У пациентов с БП в результате ВЧС ВПЯ тремор уменьшался на 85–95% [106]. Примечательно, что совместная ВЧС СТЯ и ВПЯ таламуса значительно сильнее подавляла тремор, чем стимуляция каждого из ядер в отдельности [107]. Проявления тремора ослабляла и ВЧС ПФЯ таламуса [108]. В частности, она уменьшала тремор рук [109]. Хотя эффект от ВЧС СТЯ был больше, чем от ВЧС ПФЯ, стимуляция последнего не вызывала дискинезии, в отличие от ВЧС СТЯ [108]. Тот факт, что ВЧС СТЯ была эффективнее для подавления тремора, чем ВЧС ПФЯ, указывает на существенный вклад именно СТЯ в появлении тремора.

Как уже указывалось, для сети, участвующей в появлении тремора, характерна сомато-топическая организация. Например, в моторной коре и мозжечке выделены соматотопические области, связанные с тремором руки и головы. Лучшие результаты достигались при ВЧС областей, расположенных в задней субталамической области, заходящей на нижние границы ВПЯ [110]. Вследствие сомато-топической организации увеличение частоты срабатывания и появление пачечных разрядов должно быть характерно только для определенной группы нейронов СТЯ. С учетом данных об увеличении активности в определенной части моторной коры при треморе покоя, интересно было бы проверить в экспериментах на приматах, может

ли фиксация на некоторое время той конечности, в которой наблюдается тремор, препятствовать его появлению. Не исключено, что в результате фиксации снизится активность определенной области коры, вследствие чего будут слабо активироваться соответствующие участки БГ, СТЯ и ЯМ и тремор прекратится.

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ УСИЛЕНИЯ ТРЕМОРА ПРИ СТРЕССЕ

Если дефицит дофамина лежит в основе возникновения тремора, то снижение активности дофаминергических клеток должно способствовать его появлению или усилению. Известно, что выраженность тремора даже у одного и того же пациента зависит от его функционального состояния [111]. У многих пациентов с БП тремор покоя существенно усиливался при стрессе [112], а противотреморный эффект леводопы был существенно меньше, чем в спокойном состоянии [113]. Показано, что стресс увеличивал выраженность и частоту тремора покоя [114]. Стресс должен влиять на активность дофаминергических клеток, поскольку выделяемый при стрессе кортизол (кортикостерон) воздействует на расположенные на этих клетках глюкокортикоидные и минералокортикоидные рецепторы. Кроме того, на моделях БП показано, что хронический стресс приводит к гибели дофаминергических клеток ЧВк [115, 116].

У минералокортикоидных рецепторов сродство с кортикостероном значительно больше, чем у глюкокортикоидных рецепторов [117, 118], поэтому влияние кортизола на изменение эффективности возбуждения дофаминергических клеток зависит от его концентрации. На культуре дофаминергической структуры крыс показано, что при низком содержании кортикостерона за счет активации минералокортикоидных рецепторов увеличиваются реакции дофаминергических клеток на деполяризующий стимул, тогда как вовлечение глюкокортикоидных рецепторов при больших уровнях кортикостерона препятствует этому эффекту [119]. При сильном стрессе уровень кортизола может быть достаточно высоким для активации глюкокортикоидных рецепторов, что может привести к ДД возбуждения дофаминергических клеток и снижению выделения дофамина. Показано, что стресс может не только усугубить имеющиеся симптомы у пациентов с БП, но и вызывать тремор у здоровых субъектов [120, 121]. Эти данные дополнительно свидетельствуют в пользу важной роли дофаминергической системы в появлении тремора.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ВЫДВИГАЕМОГО ГИПОТЕТИЧЕСКОГО МЕХАНИЗМА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ТРЕМОРА ПОКОЯ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА С ИЗВЕСТНЫМИ ГИПОТЕЗАМИ

Ряд положений предлагаемого гипотетического механизма возникновения тремора покоя при БП отличается от гипотез, выдвинутых другими исследователями. Например, авторы работы [122] предположили, что тремор покоя при БП генерируется в нейронной сети, включающей СТЯ и ВЛ. Однако современные исследования не выявили проекций из СТЯ в ВЛ (см., например [123]). Выдвинуто предположение, что в основе тремора, вызванного дефицитом дофамина, лежат такие изменения активности в цепи, включающей кору, таламус, БГ и СТЯ, которые приводят к усилению ингибирования нейронов таламуса со стороны БШв и ЧВр [124]. В таком случае не ясно, как треморная активность передается в новую кору. Тот же аргумент относится к механизму, обсуждаемому в работе [124], авторы которой полагают, что к тремору при БП приводит осцилляторная активность, возникающая в цепи СТЯ–БШн, но вход из ППЯ в БШв подавляет передачу такой активности в кору.

В предлагаемом нами гипотетическом механизме передача “треморной” активности осуществляется благодаря возрастанию активности нейронов ППЯ и ГЯМ, вызванному увеличением активности СТЯ и последующему усилению возбуждения нейронов таламуса со стороны ППЯ и ГЯМ. Такой механизм позволяет объяснить экспериментально наблюдаемое увеличение активности в цепи М–Т–К при треморе покоя. Хотя в работах [2, 3] отмечено, что СТЯ может влиять на функционирование мозжечка, но не указан механизм этого влияния; не учтено участие ППЯ, не упоминается то обстоятельство, что новая кора моносинаптически возбуждает СТЯ через гиперпрямой путь в БГ. В модели “переключатель диммер”, которая базируется на нейронной сети, состоящей из коры, БГ, таламуса и мозжечка, предполагается, что при БП потеря дофаминергических клеток приводит к нарушению функционирования бледного шара, а через него ВЛп [2, 3, 5, 125, 126]. Было предположено также, что треморная активность возникающая в БШв, затем распространяется в цепь М–Т–К, в которой ритм тремора возрастает и его амплитуда увеличивается, причем на цепь М–Т–К влияет кора, а не мозжечок [127]. При этом опираются на полученные на здоровых испытуемых данные о том, что цепь М–Т–К имеет тенденцию к генерации осцилляторного ритма с частотой 6–9 Гц [127]. Однако эта частота выше частоты тремора покоя. Кроме то-

го, из этой модели также не ясно, почему ГАМКергические клетки БШв способствуют увеличению активности таламуса и новой коры.

Авторы работы [88] предполагают, что к появлению осцилляций в цепи СТЯ–БШн может привести вызванное дефицитом дофамина изменение активности нейронов стриатума, проецирующихся на нейроны БШн. Эти осцилляции с частотой 0.4–1.8 Гц наблюдались в экспериментах *in vitro*. Однако не известно, как эти осцилляции могут быть связаны с частотой тремора и наблюдаются ли они *in vivo*. Существует мнение, что тремор покоя появляется, когда высокочастотные (12–15 Гц) осцилляции в БГ трансформируются в осцилляции с частотой (4–6 Гц) в таламическом ядре ВЛ [128]. Трансформация происходит благодаря таламо-паллидарным взаимодействиям, которые определяют частоту тремора во всей сети [128]. Эта предположение базируется на данных, полученных в экспериментах *in vitro*. Кроме того, частоту осцилляций в БШ с частотой 5 Гц наблюдали и при наличии тремора, и в его отсутствие [129]. Отсутствие специфичности трансформации частоты осцилляций не позволяет рассматривать этот механизм как возможно лежащий в основе тремора покоя.

В работе [130] предложена модель “палец-переключатель диммер”, где тремор покоя при БП запускается патологической активностью БГ (которые играют роль пальца), продолжает генерироваться за счет изменений активности нейронов таламуса (которые играют роль переключателя) и модулируется активностью мозжечка (играет роль диммера). В этой модели ключевой структурой является таламус, в активности нейронов которого могут возникать осцилляции с частотой тремора, если их мембрана гиперполяризована или уменьшен возбудительный драйв [131]. Гиперполяризация мембраны может быть связана с увеличением активности нейронов БШв. Однако, как уже указывалось, уменьшение возбудительного драйва противоречит экспериментальным данным об увеличении активности таламических клеток при треморе. Согласно этой модели, треморная активность в БГ является эфферентной копией корковой или таламической активности [130]. В качестве доказательства приведен тот факт, что повреждение задней части ВЛ или вентрального промежуточного ядра таламуса препятствует тремору [130]. Однако известно, что повреждение и других структур в цепи, в которой распространяется треморная активность, препятствует тремору.

Согласно точке зрения, изложенной в работе [23], влияние дофамина на тремор определяется его воздействием на таламус, а не на мозжечок, на который дофамин не влияет. В нашей модели

учтено то обстоятельство, что плотность дофаминовых рецепторов наибольшая в стриатуме, а не в таламусе, поэтому вызванные дефицитом дофамина изменения функционирования должны быть сильнее в БГ, а затем происходить реорганизация активности в структурах, на которые проецируются нейроны БГ. Кроме того, как указывалось выше, на нейронах мозжечка имеются дофаминовые рецепторы, так что дефицит дофамина должен приводить к перестройке активности и в мозжечке.

Предлагаемый нами гипотетический механизм имеет частичное сходство с работами [20, 132], в которых отмечено, что триггером тремора являются БГ, а сеть мозжечка ответственна за его амплитуду, тогда как таламус не является генератором тремора. Кроме того, имеется частичное сходство с механизмом, предложенным в работе [6]. Автор указанной работы опирается на данные о том, что дефицит дофамина в стриатуме приводит к увеличению активности нейронов БШв/ЧВр и снижению активности нейронов БШн. Отмечено, что растормаживание нейронов СТЯ со стороны БШн приводит к увеличению активности нейронов БШв/ЧВр. Отмечена также роль нейронной сети мозжечка, которая через ГЯМ влияет на активность таламуса [6]. Однако автор указанной работы полагает, что механизм участия цепи М—Т—К в появлении тремора покоя остается неизвестным, так как не ясно, каким образом БГ влияют на активность нейронов ГЯМ и как ГЯМ влияет на активность БГ. Возможные механизмы этих влияний предложены в настоящей работе. Также дано объяснение экспериментально наблюдаемого увеличения коррелирующей с тремором активности в мозжечке, таламусе и коре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный гипотетический механизм появления тремора покоя при болезни Паркинсона позволяет объяснить ряд известных экспериментальных данных и лишен ряда неопределенностей, присущих другим гипотезам. Этот механизм базируется на проведенном нами ранее анализе влияния дофамина на функционирование нейронной сети, включающей кору, БГ, таламус, мозжечок, СТЯ и ППЯ. Согласно выдвигаемой гипотезе, в основе появления тремора покоя лежит вызванная дефицитом дофамина модификация эффективности кортико-стриатных и таламо-стриатных входов, ведущая к изменениям функционирования нейронов стриатума и их клеток-мишеней в БШв и БШн. Изменения проявляются в снижении активности нейронов БШн, уменьшении его ингибирующего действия

на нейроны новой коры, СТЯ и БШв. В результате увеличивается активность нейронов БШв, новой коры, СТЯ и клеток-мишеней СТЯ в ППЯ, ЯМ и ГЯМ. Последующее усиление возбуждающего действия мозжечка на нейроны таламуса передается в новую кору и стриатум. Согласно предлагаемому механизму, степень возбуждения нейронов субталамического ядра определяет амплитуду тремора. Наблюдающееся при треморе покоя возрастание активности в мозжечково-таламо-кортикальной цепи указывает на то, что коррелирующее с амплитудой тремора увеличение возбуждающего действия нейронов ГЯМ на таламические ядра превалирует над усилением их торможения со стороны БШв. Предположено, что появление в сети пачечной активности с частотой тремора является следствием гиперполяризации мембраны нейронов СТЯ, вызванной усилением торможения со стороны БШв. Основное отличие предлагаемого гипотетического механизма появления тремора покоя при БП от известных к настоящему времени гипотез состоит в предположении, что в появлении пачечной активности с частотой тремора покоя участвует нейронная цепь, включающая СТЯ, БШн и БШв. Кроме того, увеличение активности нейронов в цепи мозжечок—таламус—кора объяснено растормаживанием активности нейронов субталамического ядра. Из предлагаемого механизма следует, что тремор покоя можно подавить или уменьшить его амплитуду не только с помощью ВЧС подкорковых структур, прерывающей “треморную” активность, но и с помощью избирательных агонистов дофаминовых D2 рецепторов и/или антагонистов аденозиновых A2A рецепторов. Эти вещества должны способствовать индукции ДД на стриопаллидарных клетках, последующему снижению ингибирования нейронов БШн, увеличению их активности и усилению ингибирования нейронов СТЯ и БШв. В литературе имеются экспериментальные свидетельства того, что в ряде случаев тремор удавалось подавить с помощью предлагаемых веществ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Louis E.D.* // Continuum (Minneapolis, Minn.). 2019. V. 25. № 4. P. 959–975.

2. Helmich R.C. // *Mov. Disord.* 2018. V. 33. № 2. P. 219–231.
3. Helmich R.C., Janssen M.J., Oyen W.J., Bloem B.R., Toni I. // *Ann. Neurol.* 2011. V. 69. № 2. P. 269–281.
4. Helmich R.C., Toni I., Deuschl G., Bloem B.R. // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2013. V. 13. № 9. P. 378.
5. Dirkx M.F., den Ouden H., Aarts E., Timmer M., Bloem B.R., Toni I., Helmich R.C. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 19. P. 5362–5372.
6. Wichmann T. // *Mov. Disord.* 2019. V. 34. № 8. P. 1130–1143.
7. Wallace M.L., Saunders A., Huang K.W., Philson A.C., Goldman M., Macosko E.Z., McCarroll S.A., Sabatini B.L. // *Neuron.* 2017. V. 94. № 1. P. 138–152.
8. Hirsch E.C., Mouatt A., Faucheux B., Bonnet A.M., Javoy-Agid F., Graybiel A.M., Agid Y. // *Lancet.* 1992. V. 340. P. 125–126.
9. Jellinger K.A. // *J. Neural Transm. Suppl.* 2002. V. 62. P. 347–376.
10. McGregor M.M., Nelson A.B. // *Neuron.* 2019. V. 101. № 6. P. 1042–1056.
11. Chen H., Zhuang P., Zhang Y.Q., Li J.Y., Li Y.J. // *Chin. Med. J. (Engl.).* 2009. V. 122. № 19. P. 2308–2314.
12. Lintas A., Silkis I.G., Albéri L., Villa A.E.P. // *Brain Res.* 2012. V. 1434. P. 142–151.
13. Liu H., Zhang J., Gao D.M. // *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2009. V. 25. № 2. P. 212–216.
14. Magnin M., Morel A., Jeanmonod D. // *Neuroscience.* 2000. V. 96. № 3. P. 549–564.
15. Weinberger M., Hamani C., Hutchison W.D., Moro E., Lozano A.M., Dostrovsky J.O. // *Exp. Brain Res.* 2008. V. 188. № 2. P. 165–174.
16. Zhang J.R., Feng T., Hou Y.N., Chan P., Wu T. // *CNS Neurosci. Ther.* 2016. V. 22. № 5. P. 378–386.
17. Singh A., Liang L., Kaneoke Y., Cao X., Papa S.M. // *J. Neurophysiol.* 2015. V. 113. № 5. P. 1533–1544.
18. Силькис И.Г. // *Успехи физиол. наук.* 2021. Т. 52. № 1. С. 1–14.
19. Zhang J., Wei L., Hu X., Xie B., Zhang Y., Wu G.R., Wang J. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2015. V. 21. № 1. P. 23–30.
20. Hallett M. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012. V. 18. Suppl. 1. P. S85–S86.
21. Prodoehl J., Planetta P.J., Kurani A.S., Comella C.L., Corcos D.M., Vaillancourt D.E. // *JAMA Neurol.* 2013. V. 70. № 1. P. 100–106.
22. Shen B., Pan Y., Jiang X., Wu Z., Zhu J., Dong J., Zhang W., Xu P., Dai Y., Gao Y., Xiao C., Zhang L. // *CNS Neurosci. Ther.* 2020. V. 26. № 2. P. 207–214.
23. Madelein van der Stouwe A.M., Nieuwhof F., Helmich R.C. // *Curr. Opin. Neurol.* 2020. V. 33. № 4. P. 474–481.
24. Levy R., Hutchison W.D., Lozano A.M., Dostrovsky J.O. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 7. P. 2855–2861.
25. Bar-Gad I., Heimer G., Ritov Y., Bergman H. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 4012–4016.
26. Bergman H., Raz A., Feingold A., Nini A., Nelken I., Hansel D., Ben-Pazi H., Reches A. // *Mov. Disord.* 1998. V. 13. Suppl. 3. P. 29–34.
27. Tai C.H., Kuo C.C. // *Acta Neurol. Taiwan.* 2006. V. 15. № 3. P. 206–216.
28. Baudrexel S., Witte T., Seifried C., von Wegner F., Beissner F., Klein J.C., Steinmetz H., Deichmann R., Roeper J., Hilker R. // *Neuroimage.* 2011. V. 55. № 4. P. 1728–1738.
29. Silkis I. // *Biosystems.* 2001. V. 59. № 1. P. 7–14.
30. Силькис И.Г. // *Успехи. физиол. наук.* 2005. Т. 36. № 2. С. 66–83.
31. Quartarone A., Cacciola A., Milardi D., Ghilardi M.F., Calamuneri A., Chillemi G., Anastasi G., Rothwell J. // *Brain.* 2020. V. 143. № 2. P. 396–406.
32. Glickstein M. // *Prog. Brain Res.* 1997. V. 114. P. 251–259.
33. Guell X., D'Mello A.M., Hubbard N.A., Romeo R.R., Gabrieli J.D.E., Whiffeld-Gabrieli S., Schmammann J.D., Anteraper S.A. // *Cereb. Cortex.* 2020. V. 30. № 4. P. 2401–2417.
34. Shinoda Y., Sugihara I., Wu H.S., Sugiuchi Y. // *Prog. Brain Res.* 2000. V. 124. P. 173–186.
35. Bostan A.C., Strick P.L. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2018. V. 19. № 6. P. 338–350.
36. Chen C.H., Fremont R., Arteaga-Bracho E.E., Khodakhah K. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 12. P. 1767–1775.
37. Hoshi E., Tremblay L., Feger J., Carras P.L., Strick P.L. // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. P. 1491–1493.
38. Milardi D., Quartarone A., Bramanti A., Anastasi G., Bertino S., Basile G.A., Buonasera P., Pilone G., Celeste G., Rizzo G., Bruschetta D., Cacciola A. // *Front. Syst. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 61.
39. Royce G.J., Bromley S., Gracco C. // *J. Comp. Neurol.* 1991. V. 306. № 1. P. 129–155.
40. Mouroux M., Hassani O.K., Féger J. // *Neuroscience.* 1997. V. 81. № 2. P. 387–397.
41. Mandelbaum G., Taranda J., Haynes T.M., Hochbaum D.R., Huang K.W., Hyun M., Umadevi Venkataraju K., Straub C., Wang W., Robertson K., Osten P., Sabatini B.L. // *Neuron.* 2019. V. 102. № 3. P. 636–652.e7.
42. Lanciego J.L., Gonzalo N., Castle M., Sanchez-Escobar C., Aymerich M.S., Obeso J.A. // *Eur. J. Neurosci.* 2004. V. 19. № 5. P. 1267–1277.
43. Orioux G., Francois C., Féger J., Yelnik J., Vila M., Ruberg M., Agid Y., Hirsch E.C. // *Neuroscience.* 2000. V. 97. № 1. P. 79–88.
44. Smith Y., Bevan M.D., Shink E., Bolam J.P. // *Neuroscience.* 1998. V. 86. № 2. P. 353–387.
45. Sato F., Parent M., Levesque M., Parent A. // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 424. № 1. P. 142–152.

46. Breit S., Lessmann L., Unterbrink D., Popa R.C., Gasser T., Schulz J.B. // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 24. № 8. P. 2275–2282.
47. Takakusaki K., Shiroyama T., Kitai S.T. // *Neuroscience.* 1997. V. 79. № 4. P. 1089–1109.
48. Florio T., Scarnati E., Confalone G., Minchella D., Galati S., Stanzione P., Stefani A., Mazzone P. // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 25. № 4. P. 1174–1186.
49. Steininger T.L., Rye D.B., Wainer B.H. // *J. Comp. Neurol.* 1992. V. 321. № 4. P. 515–543.
50. Benarroch E.E. // *Neurology.* 2013. V. 80. № 12. P. 1148–1155.
51. Saper C.B., Loewy A.D. // *Brain Res.* 1982. V. 252. P. 367–372.
52. Erro E., Lanciego J.L., Giménez-Amaya J.M. // *Exp. Brain Res.* 1999. V. 127. № 2. P. 162–170.
53. Melzer S., Gil M., Koser D.E., Michael M., Huang K.W., Monyer H. // *Cell Rep.* 2017. V. 19. № 5. P. 1045–1055.
54. Rock C., Zurita H., Wilson C., Apicella A.J. // *Elife.* 2016. V. 5. pii: e15890.
55. Wall N.R., De La Parra M., Callaway E.M., Kreitzer A.C. // *Neuron.* 2013. V. 79. № 2. P. 347–360.
56. Nambu A., Tokuno H., Hamada I., Kita H., Imanishi M., Akazawa T., Ikeuch Y., Hasegawa N. // *J. Neurophysiol.* 2000. V. 84. № 1. P. 289–300.
57. Romanelli P., Bronte-Stewart H., Heit G., Schaal D.W., Esposito V. // *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 2004. V. 82. № 5–6. P. 222–229.
58. Lee M.S., Rinne J.O., Marsden C.D. // *Yonsei. Med. J.* 2000. V. 41. № 2. P. 167–184.
59. Jaarsma D., Ruigrok T.J., Caffé R., Cozzari C., Levey A.I., Mugnaini E., Voogd J. // *Prog. Brain Res.* 1997. V. 114. P. 67–96.
60. Vitale F., Mattei C., Capozzo A., Pietrantonì I., Mazzone P., Scarnati E. // *Neuroscience.* 2016. V. 317. P. 12–22.
61. Rinaldo L., Hansel C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 11181–11186.
62. Bevan M.D., Booth P.A.C., Eaton S.A., Bolam J.P. // *J. Neuroscience.* 1998. V. 18. № 22. P. 9438–9452.
63. Smith A.D., Bolam J.P. // *Trends Neurosci.* 1990. V. 13. № 7. P. 250–265.
64. Saunders A., Oldenburg I.A., Berezovskii V.K., Johnson C.A., Kingery N.D., Elliott H.L., Xie T., Gerfen C.R., Sabatini B.L. // *Nature.* 2015. V. 521. № 7550. P. 85–89.
65. Kress G.J., Yamawaki N., Wokosin D.L., Wickersham I.R., Shepherd G.M., Surmeier D.J. // *Nature Neurosci.* 2013. V. 16. P. 665–667.
66. Gao D.M., Benazzouz A., Piallat B., Bressan K., Ilinsky I.A., Kultas-Ilinsky K., Benabid A.L. // *Neuroscience.* 1999. V. 88. № 1. P. 201–212.
67. Pong M., Horn K.M., Gibson A.R. // *Brain Res. Rev.* 2008. V. 58. № 2. P. 249–264.
68. Whittington M.A., Traub R.D., Jefferys J.G.R. // *Nature.* 1995. V. 373. № 6515. P. 612–615.
69. Magloire V., Mercier M.S., Kullmann D.M., Pavlov I. // *Neuroscientist.* 2019. V. 25. № 4. P. 344–358.
70. Floran B., Floran L., Nandi Sierra A., Aceves J. // *Neurosci. Lett.* 1997. V. 237. № 1. P. 1–4.
71. Dupuis J.P., Feyder M., Miguelez C., Garcia L., Morin S., Choquet D., Hosy E., Bezard E., Fisone G., Bioulac B.H., Baufreton J. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 36. P. 14331–14341.
72. Aceves J., Floran B., Sierra A., Mariscal S. // *Biol. Psychiatry.* 1995. V. 19. № 5. P. 727–739.
73. Ferre S., O'Connor W.T., Svenningsson P., Bjorklund L., Lindberg J., Tinner B., Stromberg I., Goldstein M., Ogren S.O., Ungerstedt U., Fredholm B.B., Fuxe K. // *Eur. J. Neurosci.* 1996. V. 8. № 7. P. 1545–1553.
74. Breit S., Bouali-Benazzouz R., Popa R.C., Gasser T., Benabid A.L., Benazzouz A. // *Exp. Neurol.* 2007. V. 205. № 1. P. 36–47.
75. Chu H.Y., Atherton J.F., Wokosin D., Surmeier D.J., Bevan M.D. // *Neuron.* 2015. V. 85. № 2. P. 364–376.
76. Bevan M.D., Hallworth N.E., Baufreton J. // *Prog. Brain Res.* 2007. V. 160. P. 173–188.
77. Robledo P., Féger J. // *Brain Res.* 1990. V. 518. № 1–2. P. 47–54.
78. Bezard E., Boraud T., Bioulac B., Gross C.E. // *Eur. J. Neurosci.* 1999. V. 11. № 6. P. 2167–2170.
79. Blandini F., Nappi G., Tassorelli C., Martignoni E. // *Prog. Neurobiol.* 2000. V. 62. № 1. P. 63–88.
80. Hughes A.J., Daniel S.E., Blankson S., Lees A.J. // *Arch. Neurol.* 1993. V. 50. № 2. P. 140–148.
81. Smith Y., Kieval J.Z. // *Trends Neurosci.* 2000. V. 23. (10 Suppl.). P. S28–S33.
82. Querejeta E., Delgado A., Valdiosera R., Erlij D., Aceves J. // *Neurosci. Lett.* 2001. V. 300. № 2. P. 79–82.
83. Yan W., Zhang Q.J., Liu J., Wang T., Wang S., Liu X., Chen L., Gui Z.H. // *Brain Res.* 2008. V. 1240. P. 204–212.
84. Müller M.L., Albin R.L., Kotagal V., Koeppe R.A., Scott P.J., Frey K.A., Bohnen N.I. // *Brain.* 2013. V. 136. (Pt. 11). P. 3282–3289.
85. Wang Z., Chen H., Ma H., Ma L., Wu T., Feng T. // *J. Neurol. Sci.* 2016. V. 371. P. 137–147.
86. Silkis I. // *Biosystems.* 2000. V. 54. № 3. P. 141–149.
87. Brown A.M., White J.J., van der Heijden M.E., Zhou J., Lin T., Sillitoe R.V. // *Elife.* 2020. V. 9. e51928.
88. Plenz D., Kital S.T. // *Nature.* 1999. V. 400. № 6745. P. 677–682.
89. García-Cabezas M.A., Martínez-Sánchez P., Sánchez-González M.A., Garzón M., Cavada C. // *Cereb. Cortex.* 2009. V. 19. № 2. P. 424–434.
90. García-Cabezas M.A., Rico B., Sánchez-González M.A., Cavada C. // *Neuroimage.* 2007. V. 34. № 3. P. 965–984.

91. *Sánchez-González M.A., García-Cabezas M.A., Rico B., Cavada C.* // J. Neurosci. 2005. V. 25. № 26. P. 6076–6083.
92. *Hamani C., Saint-Cyr J.A., Fraser J., Kaplitt M., Lozano A.M.* // Brain. 2004. V. 127. Pt. 1. P. 4–20.
93. *van Nuland A.J.M., den Ouden H.E.M., Zach H., Dirkx M.F.M., van Asten J.J.A., Scheenen T.W.J., Toni I., Cools R., Helmich R.C.* // Hum. Brain Mapp. 2020. V. 41. № 4. P. 1017–1029.
94. *Nambu A.* // Front. Neuroanat. 2011. V. 5. P. 26.
95. *Betz A.J., Vontell R., Valenta J., Worden L., Sink K.S., Font L., Correa M., Sager T.N., Salamone J.D.* // Neuroscience. 2009. V. 163. № 1. P. 97–108.
96. *Correa M., Wisniecki A., Betz A., Dobson D.R., O'Neill M.F., O'Neill M.J., Salamone J.D.* // Behav. Brain Res. 2004. V. 148. № 1–2. P. 47–54.
97. *Bara-Jimenez W., Sherzai A., Dimitrova T., Favitt A., Bibbiani F., Gillespie M., Morris M.J., Mouradian M.M., Chase T.N.* // Neurology. 2003. V. 61. № 3. P. 293–296.
98. *Kanda T., Jackson M.J., Smith L.A., Pearce R.K., Nakamura J., Kase H., Kuwana Y., Jenner P.* // Exp. Neurol. 2000. V. 162. № 2. P. 321–327.
99. *Dirkx M.F., den Ouden H.E., Aarts E., Timmer M.H., Bloem B.R., Toni I., Helmich R.C.* // Brain. 2017. V. 140. № 3. P. 721–734.
100. *Zach H., Dirkx M., Pasman J.W., Bloem B.R., Helmich R.C.* // Parkinsonism Relat. Disord. 2017. V. 35. P. 48–54.
101. *Силькис И.Г.* // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 4. С. 287–299.
102. *Diamond A., Shahed J., Jankovic J.* // J. Neurol. Sci. 2007. V. 260. № 1–2. P. 199–203.
103. *Chiken S., Nambu A.* // Neuroscientist. 2016. V. 22. № 3. P. 313–322.
104. *Sharma V.D., Mewes K., Wichmann T., Bueteifisch C., Willie J.T., DeLong M.* // Acta Neurochir. (Wien). 2017. V. 159. № 5. P. 789–793.
105. *Akram H., Dayal V., Mahlkecht P., Georgiev D., Hyam J., Foltynie T., Limousin P., De Vita E., Jahanshahi M., Ashburner J., Behrens T., Hariz M., Zrinzo L.* // Neuroimage Clin. 2018. V. 18. P. 130–142.
106. *Reinacher P.C., Amtage F., Rijntjes M., Piroth T., Prokop T., Jenkner C., Kätzler J., Coenen V.A.* // JMIR Res. Protoc. 2018. V. 7. № 1. P. e36.
107. *Neudorfer C., Hinzke M., Hunsche S., El Majdoub F., Lozano A., Maarouf M.* // Neuromodulation. 2019. V. 22. № 4. P. 493–502.
108. *Kerkerian-Le Goff L., Jouve L., Melon C., Salin P.* // Parkinsonism Relat. Disord. 2009. V. 15. Suppl. 3. P. S167–S170.
109. *Peppe A., Gasbarra A., Stefani A., Chiavalon C., Pierantozzi M., Fermi E., Stanzione P., Caltagirone C., Mazzone P.* // Parkinsonism Relat. Disord. 2008. V. 14. № 6. P. 501–504.
110. *Al-Fatly B., Ewert S., Kübler D., Kroneberg D., Horn A., Kühn A.A.* // Brain. 2019. V. 142. № 10. P. 3086–3098.
111. *Zach H., Dirkx M., Bloem B.R., Helmich R.C.* // J. Parkinsons Dis. 2015. V. 5. № 3. P. 471–474.
112. *Raethjen J., Austermann K., Witt K., Zeuner K.E., Papengut F., Deuschl G.* // Mov. Disord. 2008. V. 23. № 7. P. 1019–1023.
113. *Zach H., Dirkx M.F., Pasman J.W., Bloem B.R., Helmich R.C.* // CNS Neurosci. Ther. 2017. V. 23. № 3. P. 209–215.
114. *Lee H.J., Lee W.W., Kim S.K., Park H., Jeon H.S., Kim H.B., Jeon B.S., Park K.S.* // J. Neurol. Sci. 2016. V. 362. P. 272–277.
115. *de Pablos R.M., Herrera A.J., Espinosa-Oliva A.M., Sarmiento M., Muñoz M.F., Machado A., Venero J.L.* // J. Neuroinflammation. 2014. V. 11. P. 34.
116. *Vyas S., Rodrigues A.J., Silva J.M., Tronche F., Almeida O.F., Sousa N., Sotiropoulos I.* // Neural Plast. 2016. V. 2016. P. 6391686.
117. *Pavlidis C., Watanabe Y., Magariños A.M., McEwen B.S.* // Neuroscience. 1995. V. 68. № 2. P. 387–394.
118. *Payne J.D., Nadel L.* // Learn. Mem. 2004. V. 11. № 6. P. 671–678.
119. *Ronken E., Mulder A.H., Schoffemeer A.N.* // Eur. J. Pharmacol. 1994. V. 263. № 1–2. P. 149–156.
120. *Hao Y., Shabanpoor A., Metz G.A.* // Neurosci. Lett. 2017. V. 651. P. 79–87.
121. *Metz G.A.* // Rev. Neurosci. 2007. V. 18. № 3–4. P. 209–222.
122. *Cagnan H., Little S., Foltynie T., Limousin P., Zrinzo L., Hariz M., Cheeran B., Fitzgerald J., Green A.L., Aziz T., Brown P.* // Brain. 2014. V. 137. Pt. 12. P. 3223–3234.
123. *Cavdar S., Özgür M., Çakmak Y.Ö., Kuvvet Y., Kunt S.K., Sağlam G.* // Acta Neurobiol. Exp. (Wars.) 2018. V. 78. № 3. P. 251–263.
124. *Hadipour Niktarash A., Shahidi G.A.* // J. Comput. Neurosci. 2004. V. 16. № 2. P. 113–127.
125. *Helmich R.C., Hallett M., Deuschl G., Toni I., Bloem B.R.* // Brain. 2012. V. 135. Pt. 11. P. 3206–3226.
126. *Kamble N., Pal P.K.* // Neurol. India. 2018. V. 66 (Supplement). P. S36–S47.
127. *Gross J., Timmermann L., Kujala J., Dirks M., Schmitz F., Salmelin R., Schnitzler A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 4. P. 2299–2302.
128. *Pare D., Curro'Dossi R., Steriade M.* // Neuroscience. 1990. V. 35. P. 217–226.
129. *Rivlin-Etzion M., Marmor O., Saban G., Rosin B., Haber S.N., Vaadia E., Prut Y., Bergman H.* // J. Neurosci. 2008. V. 28. P. 633–649.
130. *Duval C., Daneault J.F., Hutchison W.D., Sadikot A.F.* // Neurobiol. Dis. 2016. V. 85. P. 49–59.
131. *Llinas R., Urbano F.J., Leznik E., Ramirez R.R., van Marle H.J.* // Trends Neurosci. 2005. V. 28. № 6. P. 325–333.
132. *Hallett M.* // Parkinsonism Relat. Disord. 2014. V. 20. Suppl. 1. P. S118–S122.

Hypothetical Mechanism of Resting Tremor in Parkinson's Disease

I. G. Silkis

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

A hypothetical mechanism of the appearance of resting tremor in Parkinson's disease has been proposed. This mechanism is based on modifications in the efficiency of excitatory inputs to the striatal spiny cells caused by dopamine deficiency. This modification leads to a reorganization of activity in the neural network, including the neocortex, thalamus, basal ganglia, cerebellum, subthalamic and pedunculopontine nuclei. As a result of this modification, the activity of striatonigral cells decreases and causes disinhibition of neurons in the internal part of the globus pallidus. At the same time, the activity of striatopallidal cells increases and leads to a decrease in the activity of neurons in the external part of the globus pallidus, and subsequent decrease in their inhibitory effect on neurons in the internal part of the globus pallidus, as well as in the subthalamic nucleus and neocortex. As a result, the activity of neurons in these structures increases. Strengthening the GABAergic input from the internal part of the globus pallidus to the neurons of the subthalamic nucleus, leading to hyperpolarization of the neuronal membrane, contributes to the generation of burst discharges with a tremor frequency. An increase in the activity of neurons in the subthalamic nucleus leads to an increase in the excitation of their target cells in the pedunculopontine nucleus and deep cerebellar nuclei. The subsequent enhancement of the excitatory effect of the cerebellum on thalamic neurons is transmitted to the neocortex and striatum. According to the proposed mechanism, the degree of excitation of neurons in the subthalamic nucleus determines the tremor amplitude and explains the fact that the increase in activity in the cerebellum, thalamus and neocortex correlates with the severity of tremor. It follows from the proposed mechanism, that since selective agonists of dopamine D2 receptors and/or antagonists of adenosine A2A receptors should contribute to the induction of LTD on striatopallidal cells, weakening their inhibitory effect on neurons in the external part of the globus pallidus and the subsequent increase in inhibition of the subthalamic nucleus, these substances can be used to suppression of resting tremor. These consequences of our hypothesis have experimental confirmation.

Keywords: resting tremor, synaptic plasticity, basal ganglia, cerebellum, thalamus, subthalamic nucleus

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 611.81.013

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГАМКергических СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В ХОДЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

© 2022 г. В. А. Разенкова¹, *, Д. Э. Коржевский¹

¹ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 07.04.2021 г.

После доработки 27.04.2021 г.

Принята к публикации 14.05.2021 г.

Целью настоящего исследования было изучение ГАМКергических нейронов головного мозга и синаптических терминалей в раннем постнатальном онтогенезе и при старении. В качестве материала были использованы срезы головного мозга крыс породы Вистар на разных сроках постнатального развития (от конца первой недели и до 24 месяцев). ГАМКергические структуры выявляли с помощью иммуногистохимической реакции на фермент синтеза ГАМК — глутаматдекарбоксилазу изоформы 67 (GAD67). Были охарактеризованы морфологические изменения, происходящие в ГАМКергической системе в ходе постнатального онтогенеза. В частности, было показано, что GAD67-иммунопозитивные синаптические окончания, у 7-дневных животных преимущественно локализованы в I слое коры. Подтверждено предположение о том, что клетки Кахаля-Ретциуса не являются ГАМКергическими. ГАМКергические нейроны были обнаружены в субвентрикулярной зоне конечного мозга на ранних сроках постнатального онтогенеза и у старых животных. Установлено, что эпителиоциты сосудистого сплетения головного мозга к концу первого месяца развития содержат GAD67 и, поэтому, могут служить источником внесинаптической ГАМК.

Ключевые слова: гамма-аминомасляная кислота, глутаматдекарбоксилаза, онтогенез, головной мозг, иммуногистохимия, конфокальная лазерная микроскопия

DOI: 10.31857/S1027813322010101

ГАМКергические структуры головного мозга представлены преимущественно тормозными интернейронами и их синаптическими терминалями. Эти нейроны представляют собой гетерогенную совокупность клеток, которые избирательно модулируют активность нейронных цепей центральной нервной системы [1, 2]. Считается, что эти клетки образуются из предшественников в эмбриональном субпаллиуме, в области ганглиозного возвышения. ГАМКергические нейроны развиваются под регуляцией типичных для субпаллиума транскрипционных факторов (семейство Dlx, Ascl1, Gsx1 и Gsx2), однако на их разнообразие влияют дополнительные транскрипционные факторы, которые ограничивают дифференцировку предшественников только в определенные типы интернейронов [3–7]. Несмотря на то, что ганглиозное возвышение считается основным источником ГАМКергических клеток, ряд авторов предполагает возможность наличия клеток-предшественников в субвентрикулярной зоне боковых желудочков мозга в постнатальном онтогенезе [2, 8–10].

В период постнатального развития происходит окончательное формирование элементов тормозной системы. Процессы миграции, происходящие в эмбриональном развитии, сменяются процессами дифференцировки и созревания. В конце первой недели после рождения начинают формироваться функциональные синаптические связи, а созревание ГАМКергических интернейронов происходит в первый месяц постнатального онтогенеза [11–13].

Известно, что ГАМКергическая система головного мозга участвует в структурной и функциональной организации процессов ЦНС в ходе развития [1, 14, 15]. На ранних этапах развития до этапов формирования синапсов, ГАМК высвобождается внесинаптически. Внесинаптическое высвобождение ГАМК создает хемотаксис, необходимый для правильной миграции фенотипически различных популяций предшественников нейронов в процессе кортикогенеза, а частичная или полная блокировка высвобождения ГАМК приводит к порокам развития кровеносных сосудов головного мозга и патологически влияет на миграцию и позиционирование интернейронов коры [16, 17].

* Адресат для корреспонденции: 197022 Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12; e-mail: valeriy.a.razenkov@yandex.ru

Несмотря на то, что существует большое количество информации о становлении ГАМКергической системы, данные о роли ГАМК в развитии противоречивы. В частности, это относится к регуляции процесса синаптогенеза, происходящего в первый месяц постнатального развития. Было показано, что в мозге молодых животных, в отсутствие глутамата, ГАМК может действовать в качестве возбуждающего нейротрансммиттера. Активация ГАМК_A рецепторов и потенциал-зависимых кальциевых каналов приводит к спонтанным деполаризациям нейронов, что необходимо для активность-зависимого образования синапсов [18–20]. Однако, другие авторы оспаривают эти предположения, обращая внимание на то, что указанные данные получены на переживающих срезах мозга, в которых присутствуют поврежденные клетки, что может приводить к ошибочным результатам [21, 22]. Их наблюдения ставят под сомнение предыдущие выводы о роли ГАМК в процессе синаптогенеза.

Таким образом, несмотря на то, что ГАМКергическая система оказывает существенное влияние на обеспечение нормального функционирования процессов и реализации функций ЦНС как в процессе развития, так и в зрелом возрасте, особенности формирования ГАМКергических интернейронов и их связей в период раннего постнатального развития, а также в процессе естественного старения остаются дискуссионными. Поэтому, целью данного исследования было изучение ГАМКергических нейронов и синаптических терминалей в раннем постнатальном онтогенезе и при старении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на парафиновых срезах головного мозга крыс-самцов породы Вистар на разных сроках постнатального развития: 7 (P7), 30 (P30) постнатальные сутки, половозрелые (5–6 месяцев) и старые (23–24 мес.) животные ($n = 5$ для каждого срока). При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ (заключение № 1/20 от 27.02.2020). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [23] и заливали в парафин по общепринятой методике. Изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм и наклеивали их на предметные стекла “Superfrost Ultra Plus” (Menzel Gläser, Германия). После депарафинирования и регидратации препаратов проводили тепловое демаскиро-

вание антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Agilent, США) в течение 24 мин. Ингибирование эндогенной пероксидазы осуществляли путем обработки срезов 3%-ным водным раствором перекиси водорода в течение 10 мин.

Для выявления ГАМКергических структур головного мозга использовали поликлональное кроличье антитело к ферменту синтеза ГАМК – глутаматдекарбоксилазе изоформы 67 (GAD67) в разведении 1 : 300 (E10260, Spring Bioscience, США). Инкубацию в первичном антителе проводили в течение трех суток при температуре 27.5°C. В качестве вторичных реагентов использовали Goat anti-rabbit HRP Conjugate из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAV IHC Detection Kit (ab236466, Abcam, Великобритания). Для световой микроскопии при выявлении продукта реакции использовали хромоген 3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Для конфокальной лазерной микроскопии после инкубации во вторичном антителе (30 минут при температуре 27.5°C) на срезы наносили козье антитело против пероксидазы хрена, конъюгированное с флуорохромом Cy3 (Jackson ImmunoResearch, США) [24]. Непосредственно в раствор антитела добавляли флуоресцентный ядерный краситель SYTOX Green в концентрации 0.5 мкмоль (Invitrogen, США) и инкубировали срезы 30 мин при температуре 27.5°C. Для постановки положительного контроля антител использовали препараты мозжечка крысы, для нейронов которых хорошо известна локализация GAD67 [25]. При постановке отрицательного контроля на один из срезов обрабатываемой серии препаратов вместо раствора первичных антител наносили раствор для разведения антител Antibody Diluent (Abcam, Великобритания). Полученные препараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия) и сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 800, оснащенного системой Airyscan (Carl Zeiss AG, Германия). Использовали объективы Plan-Apochromat 20×/0.8 M27 и Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). Для возбуждения флуоресценции Cy3 и SYTOX Green использовали лазеры с длиной волны 561 и 488 нм соответственно. Обработку полученных изображений проводили с помощью программ ZEN-2012 (Carl Zeiss AG, Германия) и ImageJ (Wayne Rasband (NIH), США). Для анализа возрастной динамики количества ГАМКергических интернейронов проводили подсчет клеток по четырём полям зрения размером 325 × 244 мкм для каждого случая. После этого количество GAD67-положительных клеток делили на общее число клеток для вычисления процентного соотношения. Среднюю интенсивность флуоресценции красного канала на каждом изображении оценивали по методике, описанной Шиханом и соавторами

[26]. Среднюю интенсивность флуоресценции представляли в виде условных единиц яркости пикселей для 8-битных изображений (от 0 до 255). Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Данные представляли в виде среднего значения $\pm$ ошибки средней. На основании проверки на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка, для сравнения данных применяли односторонний дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса. Последующее сравнение групп осуществляли с помощью *post-hoc*-критерия Данна. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предварительная часть исследования заключалась в проверке возможности визуализации синапсов при использовании иммуногистохимической реакции на GAD67 на препаратах головного мозга половозрелых крыс при использовании конфокального микроскопа Zeiss LSM 800. При использовании объектива Plan-Apochromat 63 $\times$ /1.40 Oil DICM27 с диаметром конфокальной диафрагмы (pinhole), равного одному диску Эйри (1 AU), оказалось возможным получить изображения, на которых отчетливо видны как тела GAD67-положительных нейронов, так и ГАМКергические синаптические терминалы (рис. 1а, б). Уменьшение диаметра диафрагмы примерно до половины диска Эйри (0.56 AU) позволило повысить аксиальную и латеральную разрешающие способности конфокального микроскопа и дифференцированно выявить ГАМКергические пресинапсы (рис. 1в). Для проверки пригодности полученного изображения для дальнейшего анализа использовали профиль Range Indicator, который преобразует исходное изображение так, что пиксели с минимальным значением яркости (0) окрашены в синий цвет, а с максимальным (255) — в красный (рис. 1г). При определенных настройках режима сканирования конфокального микроскопа возможно получение изображений, на которых некоторые объекты будут иметь значения яркости 255 (т.е., будут переэкспонированы), что можно использовать для конкретных целей. В настоящей работе подобную настройку сканирования применяли для получения изображений с четкой визуализацией не только синаптических терминалов ГАМКергических клеток, но и тел самих интернейронов (см. рис. 1б). Необходимость такой настройки прибора связана с тем, что цитоплазма интернейронов характеризуется более слабыми значениями сигнала GAD67 по сравнению с пресинапсами.

В ходе основного иммуногистохимического исследования было выявлено, что на 7-е сутки постнатального развития характерно интенсивное окрашивание вентральной области мозга и

I слоя неокортекса (рис. 2а). Интенсивная окраска I слоя коры обусловлена скоплением большого количества ГАМКергических терминалов. При этом тела ГАМКергических интернейронов располагаются в нижележащих слоях (V–VI). Было показано, что для I слоя цингулярной области коры характерно присутствие не только синаптических терминалов, но и тел клеток с выраженной цитоплазматической реакцией GAD67. Фермент распределен равномерно по цитоплазме перикариона нейронов (но не выявляется в ядре), отростки клеток не выявляются или прослеживаются только на небольшом расстоянии от тела клетки. В подкорковых структурах усиленная реакция наблюдается в обонятельном бугорке, гипоталамусе и globus pallidus. Для септальной зоны головного мозга характерно неравномерное окрашивание латерального септального ядра. В субвентрикулярной зоне выявляются клетки с отчетливой цитоплазматической реакцией на GAD67 (рис. 3а).

Несмотря на наличие GAD67-положительных терминалов аксонов, выявляемых во всех структурах мозга к концу первой недели постнатального развития, на этом сроке не наблюдаются сформированные ГАМКергические аксосоматические пресинапсы на интернейронах.

На 30-е сутки постнатального развития проявляется четкая слоистость коры, обусловленная интенсивным окрашиванием синаптических окончаний ГАМКергических интернейронов, сконцентрированных на телах и отростках пирамидных клеток III и V слоя (рис. 2б). Для инсुлярной зоны коры характерна слабая окраска при сохранении ламинарности распределения GAD67. Скопления ГАМКергических терминалов в I слое коры, характерного для 7-х постнатальных суток, на этом сроке не наблюдается. Тела GAD67-положительных нейронов располагаются во всех слоях коры. На телах интернейронов появляются синаптические окончания. В отличие от P7, у животных P30 как в caudate-putamen, так и в globus pallidus наблюдается окрашивание средней интенсивности. Для этого срока также характерно наибольшее процентное содержание ГАМКергических интернейронов как в коре, так и в подкорковых структурах (табл. 1). GAD67-положительные структуры в субвентрикулярной зоне на этом сроке не выявляются (рис. 3в). Интересно, что у однопоясчатых животных появляется реакция на GAD67 в сосудистом сплетении (рис. 4б). Фермент содержится в апикальной части эпителиальных клеток. Средняя интенсивность флуоресценции невелика и составляет 68.71 ± 1.58 условных единиц яркости.

У половозрелых животных (5–6 мес.), подобно 30-дневным, усиленная реакция наблюдается в III и V слоях коры. В нейропиле I и IV слоев коры ГАМКергические терминалы расположены с меньшей плотностью. Высокой интенсивностью окра-

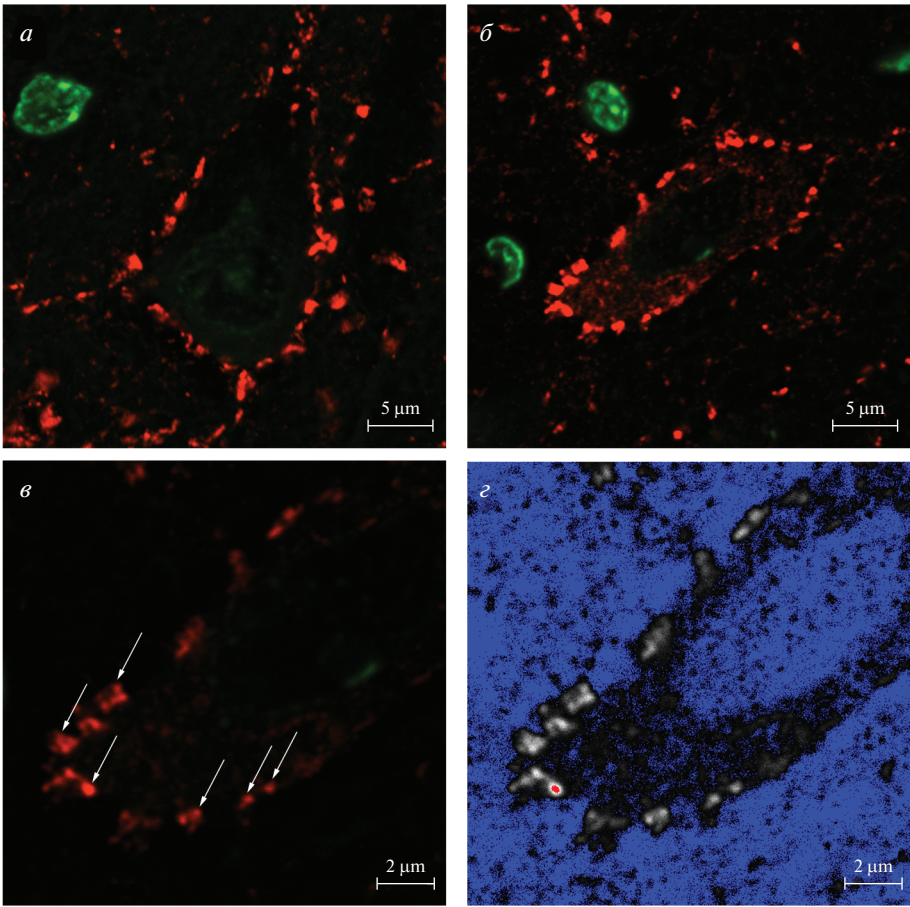


Рис. 1. Синаптические терминалы на телах нейронов в головном мозге половозрелых крыс. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). *а* – пирамидный нейрон III слоя коры; *б* – корковый ГАМКергический интернейрон; *в* – корковый ГАМКергический интернейрон, большое увеличение; *г* – корковый ГАМКергический интернейрон, большое увеличение, профиль Range Indicator. Стрелки указывают на ГАМКергические синаптические терминалы.

шивания отличается цингулярная и сенсорная зоны коры, остальные области коры (за исключением инсулярной) характеризуются средней интенсивностью. Тела ГАМКергических нейронов имеют разнообразную морфологию и располагаются во всех слоях коры. Однако, присутствие тел нейронов в I слое коры наблюдали только в определенных областях: в основном в цингулярной коре и вторичной двигательной коре. Благодаря неодинаковой интенсивности иммуногистохимической реакции возможно различение globus pallidus и caudate-putamen на анатомическом уровне

(рис. 2*в*). В подкорковых структурах можно также выявить две популяции ГАМКергических интернейронов: клетки с сильно выраженной реакцией на GAD67 и клетки с умеренной реакцией на GAD67. В субвентрикулярной зоне отсутствуют клетки с положительной иммуногистохимической реакцией на GAD67. В этом возрасте также наблюдается скопление фермента в апикальной части эпителиальных клеток (рис. 4*в*), при этом средняя интенсивность флуоресценции наивысшая среди исследуемых сроков (183.4 ± 3.05 условных единиц яркости).

Таблица 1. Процентное содержание GAD67-положительных клеток в кортексе и в подкорковых структурах головного мозга на разных сроках (средняя $\pm$ ошибка средней (число значений, использовавшихся для подсчета среднего)). *P*-value: * – <0.01

Зона	P7	P30	Половозрелые	Старые
Кора	6.96 ± 0.3 (20)	$15.76 \pm 0.89^*$ (20)	7.21 ± 0.58 (20)	7.96 ± 0.49 (20)
Стриатум	4.38 ± 0.13 (20)	$6.25 \pm 0.31^*$ (20)	4.12 ± 0.57 (20)	3.72 ± 0.27 (20)

У старых крыс (23–24 мес.), также как у P30 и взрослых животных, распределение фермента позволяет четко выделить слои коры (рис. 2г). Сохраняется различная интенсивность окрашивания областей коры, характерная для более ранних сроков (P30 и взрослые животные), а именно: высокоинтенсивная окраска в цингулярной и сенсорной областях, окраска средней интенсивности двигательной и пириформной областей, слабая окраска инсулярной зоны коры. Было отмечено, что в I слое определенных областей коры головного мозга, а именно в цингулярной, двигательной и сенсорной, выявляются тела ГАМКергических нейронов. Сохраняется различная интенсивность в окрашивании caudate-putamen и globus pallidus (см. рис. 2). У старых животных, как и у 7-дневных, можно заметить ГАМКергические клетки в субвентрикулярной зоне (рис. 3б). На этом сроке средняя интенсивность флуоресценции GAD67 в сосудистом сплетении понижается до 53.01 ± 1.16 условных единиц яркости. Различия по данному параметру были статистически значимыми для всех исследуемых сроков ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предварительное исследование показало возможность выявления тел ГАМКергических нейронов и аксонных терминалей на срезах головного мозга крыс с использованием методов конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Несмотря на то, что синаптические терминали в связи с их малым размером традиционно изучают с применением методов электронной микроскопии, их наблюдение в головном мозге возможно и на световом уровне при использовании антител к белкам, избирательно локализованным в районе синаптических контактов. Наиболее легко визуализируемы крупные синапсы, например, терминали моховидных волокон гиппокампа и мозжечка [27]. Выявление более мелких структур реализуемо благодаря тому, что высокая концентрация антигена в малом объеме позволяет получить сигнал с высокой интенсивностью флуоресценции, который может регистрироваться конфокальным микроскопом как дискретная структура, если расположение этих структур не ближе, чем разрешающая способность микроскопа. В работах по изучении морфологии синапсов, выполненных с использованием электронной микроскопии [28–30], можно обнаружить, что ГАМКергические синаптические терминали имеют размеры примерно от 0.3 мкм до 2 мкм. Поскольку латеральная разрешающая способность конфокального микроскопа Zeiss LSM 800 для объектива Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 и лазера длиной волны 561 нм (которую использовали для возбуждения спектра флуоресценции Cy3) составляет около 0.16 мкм, техническая возможность для выявления синапсов суще-

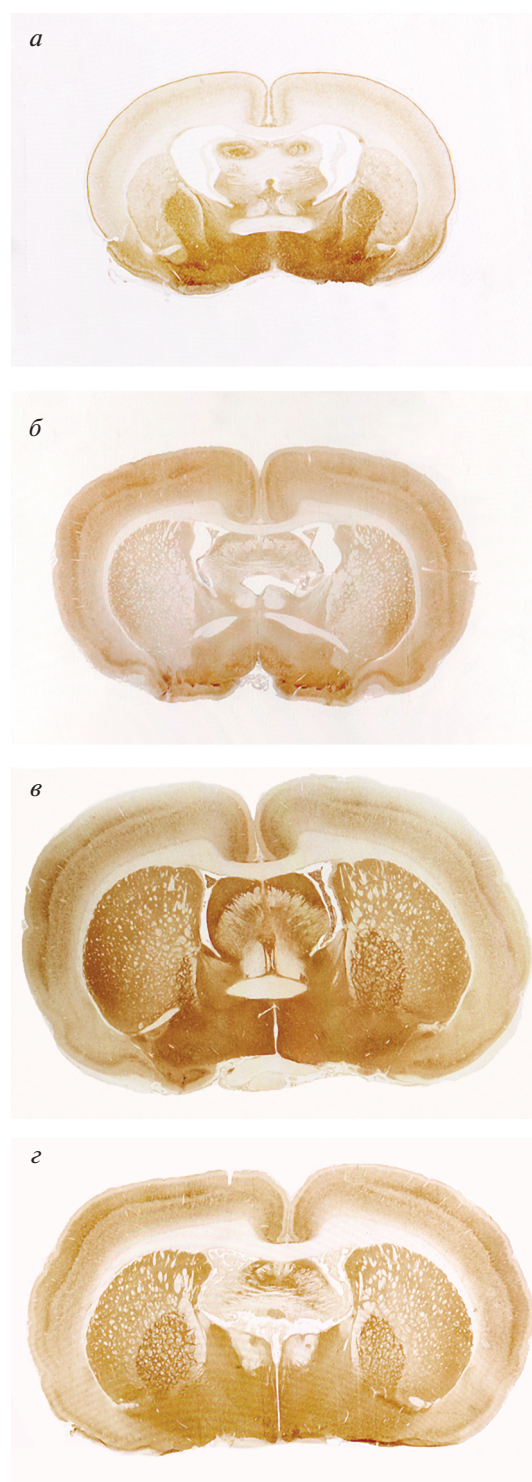


Рис. 2. Распределение ГАМКергических структур в головном мозге на разных сроках постнатального онтогенеза. Иммуногистохимическая окраска на GAD67. а – 7 сут постнатального развития; б – 30 сут постнатального развития; в – взрослое животное; г – старое животное.

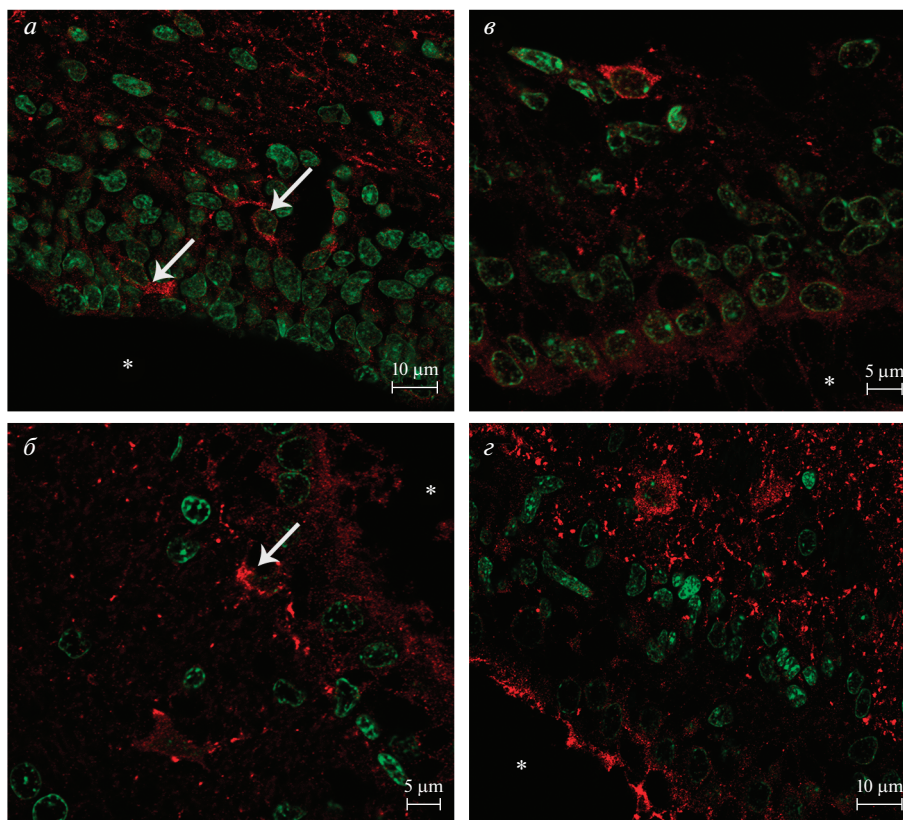


Рис. 3. ГАМКергические нейроны субвентрикулярной зоны. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). *a* – 7 сут постнатального развития; *б* – старое животное; *в* – 30 сут постнатального развития; *г* – взрослое животное. Стрелка указывает на ГАМКергические нейроны в субвентрикулярной зоне, звездочка – полость желудочка.

ствуется. Настоящее исследование подтверждает возможность выявления дискретных GAD67-иммунопозитивных структур, которые являясь аксосоматическими синапсами (см. рис. 1).

В ходе развития ГАМКергические интернейроны претерпевают различные молекулярные, структурные и функциональные изменения, которые оказывают влияние на состояние и функционирование ЦНС. ГАМКергические клетки головного мозга формируются в субпаллиуме и заселяют кору головного мозга в ходе тангенциальной миграции в процессе эмбриогенеза [2, 31]. Эти клетки располагаются во всех слоях коры и различаются не только морфологически, но и по своим биохимическим, электрофизиологическим свойствам и формируемым межклеточным контактам [32, 33]. Такое разнообразие необходимо для четкого модулирования активности как основных эфферентов коры – пирамидных нейронов, так и других клеток. Высокое разнообразие морфологических, молекулярных и физиологических характеристик ГАМКергических клеток привело к разработке сложной номенклатуры тормозных нейронов коры головного мозга [34–36].

В первом слое коры у 7-дневных крыс во всех областях коры, кроме цингулярной и пириформной, наблюдали большое количество ГАМКергических структур. Первый слой коры головного мозга – единственный слой, который не содержит возбуждающих клеток. Известно, что в первый слой свои аксоны проецируют ГАМКергические клетки Мартинотти, устанавливающие синаптические связи с дендритами пирамидных клеток. Было выявлено, что большинство тормозных синапсов в течение первой недели постнатального развития создается клетками Мартинотти именно на апикальных дендритах пирамидных клеток [37], отростки которых достигают I слоя коры. В коре развивающегося мозга в I слое расположены также рилин-продуцирующие клетки Кахалы–Ретциуса, которые регулируют миграцию кортикальных нейронов во время эмбриональной и ранней постнатальной стадий развития [38]. Поскольку клетки Кахалы–Ретциуса экспрессируют ГАМК_A рецепторы как во время эмбрионального, так и во время постнатального развития, а соматостатин-содержащие клетки Мартинотти дифференцируются достаточно рано, было высказано предположение, что наблюдаемые в первом слое ГАМКергические

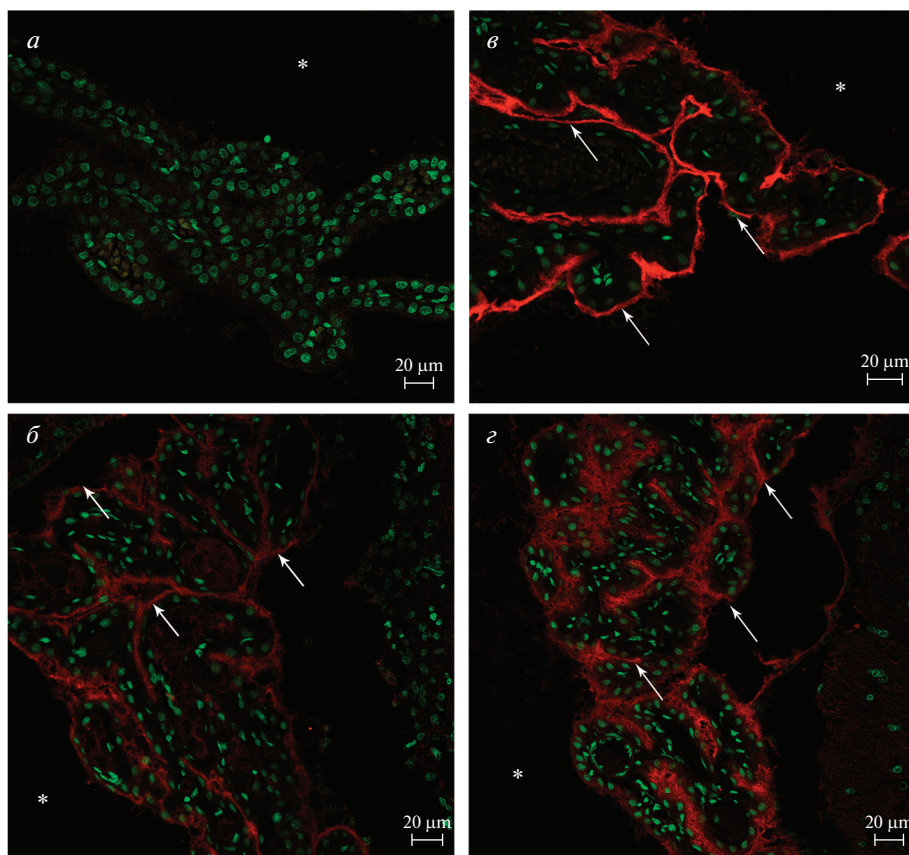


Рис. 4. GAD67 в сосудистом сплетении. Иммуногистохимическая окраска на GAD67 (красный) с подкраской ядер SytoxGreen (зеленый). *a* – 7 сут постнатального развития, отсутствие реакции; *б* – 30 сут постнатального развития; *в* – взрослое животное, интенсивная реакция; *г* – старое животное. Стрелка указывает на скопление фермента в апикальной части эпителиальных клеток, звездочка – полость желудка.

терминали принимают участие в формировании колонок головного мозга за счет регуляции работы клеток Кахаля–Ретциуса [39–41]. Кроме того, поскольку во взрослом мозге рилин-содержащие клетки относятся к ГАМКергическим интернейронам, было высказано предположение о том, что клетки Кахаля–Ретциуса крыс претерпевают фенотипическую трансформацию в интернейроны неокортекса [42, 43]. Исследования, проводимые на мышах, однако, показали, что эти клетки погибают путем апоптоза в ходе первых двух недель постнатального развития [44, 45]. Поскольку у 7-дневных животных не было обнаружено ни одной GAD67-положительной клетки в I слое разных отделов неокортекса, наши данные свидетельствуют о том, что клетки Кахаля–Ретциуса крыс, как минимум на момент окончания первой недели постнатального развития не являются ГАМКергическими.

Считается, что в первом слое коры взрослого мозга располагаются два типа ГАМКергических интернейронов: нейроглиаформные и однопучковые клетки (single-bouquet cells). Однопучко-

вые клетки регулируют работу интернейронов II/III слоев коры, формируя на них однонаправленные аксональные синаптические терминалы [46]. Нейроглиаформные клетки примечательны тем, что оказывают свое тормозное влияние не только путем синаптической передачи, но и путем внесинаптической экскреции ГАМК [47]. Примечательно, что GAD67-положительные клетки в первом слое коры в ходе исследования чаще всего наблюдали в цингулярной зоне на всех сроках развития. Это соответствует представлениям о сложной структуре этой области коры [48, 49]. Особенности клеточного состава первого слоя в различных зонах коры половозрелых животных могут быть связаны с функциональной специализацией структур первого слоя коры.

Несмотря на наши данные о том, что первые ГАМКергические синапсы можно наблюдать в коре на ранних сроках, сформированные синаптические терминалы на интернейронах в настоящей работе наблюдали к концу первого месяца постнатального развития. У мышей, первые синапсы начинают формироваться на 5–8 постна-

тальные сутки, а пик синаптогенеза приходится на 10-е сутки [37]. У крыс активное созревание ГАМКергических синапсов также происходит к концу первой постнатальной недели. Показано, что частота спонтанных постсинаптических токов от ГАМКергических клеток приобретает статистически достоверные ненулевые значения только к P7, а отношение частот сигналов глутамат/ГАМК превышало единицу до 11-х суток постнатального развития, что говорит о более раннем развитии глутаматергической проводимости по сравнению с ГАМКергической [50]. Предположительно, это связано с формированием таламокортикальных связей, которые формируются после первой недели развития [51]. Таким образом, развитие ГАМКергической иннервации обусловлено необходимостью обработки сенсорной информации. С помощью поведенческих тестов было выявлено, что на второй неделе жизни детеныши крыс действительно начинают исследовать окружающую среду [50]. Поэтому кажется логичным, что к середине второй недели постнатального развития, после полного развития моторных и сенсорных функций, происходит усиление синаптогенеза, который продолжается в течение длительного периода до 30-х суток.

На 30-е сутки постнатального развития также регистрировали самое высокое содержание ГАМКергических интернейронов среди всех возрастов как в коре, так и в подкорковых структурах. В недавних исследованиях распределения рецепторов ГАМК было выявлено увеличение плотности ГАМК_B рецепторов от P30 до P90 [52]. Поскольку происходит увеличение плотности постсинапсов, можно было бы ожидать увеличение числа пресинапсов вследствие либо появления новых связей между нейронами, либо увеличения количества самих ГАМКергических нейронов. Это позволяет предположить участие ГАМКергических нейронов в поздних стадиях развития головного мозга.

При постановке иммуногистохимической реакции на GAD67 наблюдали окрашивание слабой интенсивности в области инсुлярной коры у крыс всех возрастов. Ключевыми нейротрансмиттерами этой области коры считаются ГАМК и дофамин. ГАМКергические интернейроны инсулярной коры получают сигналы от аксонов дофаминергических нейронов вентральной области покрышки [53]. Поскольку исследования показали, что дофаминергическая стимуляция может влиять на уровни синтеза мРНК GAD67 [54], можно предположить, что низкое содержание фермента в инсулярной коре может быть связано с дофаминовым контролем.

Низкое содержание GAD67 также могло бы быть связано с преобладанием далекопроецирующих интернейронов над интернейронами, образу-

ющими связи внутри области инсулярной коры. Поскольку GAD67, в отличие от других ферментативных маркеров нейронов: тирозингидроксилазы и холинацетилтрансферазы [55], не распределен равномерно по цитоплазме клетки, интенсивность окрашивания кажется меньшей, чем в других зонах коры. Однако на сегодняшний день информации об интернейронном составе этой области и их связях недостаточно, чтобы сделать вывод о снижении интенсивности окрашивания GAD67 в связи с преобладанием далекопроецирующих нейронов в инсулярной области коры.

Как было показано, наибольшей интенсивностью окрашивания характеризуются вентральные структуры мозга. К 30-м постнатальным суткам резкое различие в интенсивности окрашивания начинает снижаться. Тем не менее, в подкорковых структурах у половозрелых животных *caudate-putamen* проявляет меньшую интенсивность окрашивания, чем *globus pallidus*, что сохраняется и при старении. Эти наблюдения согласуются с данными о субпаллиальном происхождении большей части ГАМКергических интернейронов головного мозга [2]. К такому же выводу пришли Давила и соавторы, которые наблюдали похожее соотношение интенсивностей окрашивания кальбиндин-положительных клеток в дорсальной и вентральной части комплекса ограда. Они также отметили кальбиндин-положительные нейроны с интенсивным и слабым окрашиванием и предположили, что интенсивность окрашивания на кальбиндин может быть связана с фенотипом ГАМКергических нейронов [56].

На ранних сроках в субвентрикулярной зоне наблюдали GAD67-положительные клетки. Поскольку предполагается, что субвентрикулярная зона служит дополнительным источником клеток-предшественники ГАМКергических нейронов [8], можно ожидать присутствие этих клеток не только на постнатальных, но и на эмбриональных стадиях развития мозга. Действительно, в экспериментах на мышцах показано, что ГАМКположительные клетки можно наблюдать в субвентрикулярной зоне в позднем пренатальном (E14-E19) и раннем постнатальном онтогенезе (P0-P8) [15]. ГАМКергические клетки также наблюдали в вентрикулярной зоне в эмбриогенезе (E14-E20) у крыс породы Вистар [57]. GAD67-положительные клетки в субвентрикулярной зоне на более поздних сроках не наблюдаются, однако присутствуют у старых животных. По всей видимости, это связано с дифференцировкой клеток нейрогенной зоны в ответ на нейродегенеративные процессы, происходящие при старении в условиях торможения миграции.

В нашем исследовании впервые было обращено внимание на онтогенетическую динамику иммунореактивности GAD67 в эпителиоцитах сосудистого сплетения. Ранее, в сосудистом сплетении мозга

эмбрионов мышей была отмечена иммуногистохимическая реакция на другой фермент синтеза ГАМК, GAD65 [58]. В противоположность этому, GAD67 на данном этапе развития не был обнаружен. Хотя в отдельных публикациях также можно наблюдать, что апикальная часть эпителиоцитов сосудистого сплетения мозга взрослых животных содержит GAD67 [59], авторы не акцентируют на этом внимания, поскольку эта область не является их зоной интереса. Из этого можно сделать вывод, что факт наличия GAD67 в этой зоне не является артефактом иммуногистохимического окрашивания. Об этом также свидетельствует то, что в препаратах отрицательного контроля никакой иммунной активности как со стороны сосудистого сплетения, так и со стороны остальных структур, не было отмечено.

Поэтому возникает вопрос, могут ли клетки сосудистого сплетения вырабатывать внесинаптическую ГАМК. Поскольку локализация фермента приближена к апикальной поверхности, а также известно, что ГАМК содержится в cerebrospinalной жидкости (ЦСЖ), можно предположить, что выработка ГАМК в сосудистом сплетении производится для дальнейшего транспорта аминокислоты в ЦСЖ. Существует мнение, что ГАМК поступает в ЦСЖ из крови [60]. Однако известно, что такой продукт сыворотки крови как транстиретин (преальбумин) попадает в ЦСЖ не из крови, но синтезируется в эпителиоцитах сосудистого сплетения [61]. Кроме того, было выявлено, что уровень транспорта ГАМК в ЦСЖ снижается у половозрелых крыс по сравнению с молодыми животными [60]. Это может косвенно указывать на то, что синтез ГАМК в апикальной части эпителиоцитов сосудистого сплетения с помощью GAD67 действительно происходит и усиливается с возрастом. Снижение интенсивности флуоресценции при старении говорит об уменьшении количества фермента у старых животных.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование характеризует морфологические изменения, происходящие в ГАМКергической системе в ходе постнатального онтогенеза. 1) Преимущественная локализация ГАМКергических синаптических структур, наблюдаемая в I слое коры 7-дневных животных, может быть связана с обеспечением процесса миграции нейронов. 2) Предполагаемые ГАМКергические клетки Кахаля–Ретциуса у крыс не выявляются с помощью иммуногистохимической реакции на GAD67, следовательно, они не являются ГАМКергическими. 3) Наличие GAD67-положительных клеток в субвентрикулярной зоне мозга на ранних сроках постнатального онтогенеза и у старых животных указывает на наличие кле-

ток-предшественников ГАМКергических нейронов и их дифференцировку в пределах данной области мозга. Их локальное появление при старении может быть связано с замедлением процесса миграции. 4) Эпителиоциты сосудистого сплетения головного мозга к концу первого месяца развития могут являться источником внесинаптической ГАМК, поступающей в cerebrospinalную жидкость.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. При проведении исследования были соблюдены все применимые международные, национальные и институциональные (заключение № 1/20 от 27.02.2020 локального этического комитета ФГБНУ “ИЭМ”) принципы ухода и использования животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kubota Y. // Curr. Opin. Neurobiol. 2014. V. 26. P. 7–14.
2. Lim L., Mi D., Llorca A., Marín O. // Neuron. 2018. V. 100. № 2. P. 294–313.
3. Wang B., Long J.E., Flandin P., Pla R., Waclaw R.R., Campbell K., Rubenstein J.L.R. // J. Comp. Neurol. 2013. V. 521. № 7. P. 1561–1584.
4. Long J.E., Cobos I., Potter G.B., Rubenstein J.L.R. // Cereb. Cortex. 2009. V. 28. P. 3797–3815.
5. Wang Y., Neubauer F.B., Lüscher H.R., Thurley K. // Eur. J. Neurosci. 2010. V. 31. № 9. P. 1582–1594.
6. Sandberg M., Flandin P., Silberberg S., Su-Feher L., Price J.D., Hu J.S., Kim C., Visel A., Nord A.S., Rubenstein J.L.R. // Neuron. 2016. V. 91. № 5. P. 1260–1275.
7. Liu Z., Zhang Z., Lindtner S., Li Z., Xu Z., Wei S., Liang Q., Wen Y., Tao G., You Y., Chen B., Wang Y., Rubenstein J.L., Yang Z. // Cereb. Cortex. 2019. V. 29. № 6. P. 2653–2667.
8. Shmakova A.A., Balatskiy A.V., Kulebyakina M.A., Schaub T., Karagyaur M.N., Kulebyakin K.Y., Rysenkova K.D., Tarabykin V.S., Tkachuk V.A., Semina E.V. // Russ. J. Dev. Biol. 2021. V. 52. № 1. P. 53–63.
9. Al-Jaberi N., Lindsay S., Sarma S., Bayatti N., Clowry G.J. // Cereb. Cortex. 2015. V. 25. № 3. P. 631–645.
10. Radonjić N.V., Ayoub A.E., Memi F., Yu X., Maroof A., Jakovcevski I., Anderson S.A., Rakic P., Zecevic N. // Cell Rep. 2014. V. 9. № 6. P. 2139–2151.
11. Okaty B.W., Miller M.N., Sugino K., Hempel C.M., Nelson S.B. // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 21. P. 7040–7052.
12. Rice F.L., Gomez C., Barstow C., Burnet A., Sands P. // J. Comp. Neurol. 1985. V. 236. № 4. P. 477–495.

13. Vincent S.L., Pabreza L., Benes F.M. // J. Comp. Neurol. 1995. V. 355. № 1. P. 81–92.
14. Foster A.C., Kemp J.A. // Curr. Opin. Pharmacol. 2006. V. 6. P. 7–17.
15. Le Magueresse C., Monyer H. // Neuron. 2013. V. 77. № 3. P. 388–405.
16. Behar T.N., Schaffner A.E., Scott C.A., O'Connell C., Barker J.L. // J. Neurosci. 1998. V. 18. № 16. P. 6378–6387.
17. Li S., Kumar P., Joshee S., Kirschstein T., Subburaju S., Khalili J.S., Kloepper J., Du C., Elkhali A., Szabó G., Jain R.K., Köhling R., Vasudevan A. // Cell Res. 2018. V. 28. № 2. P. 221–248.
18. Oh W.C., Lutz S., Castillo P.E., Kwon H.B. // Science. 2016. V. 353. № 6303. P. 1037–1040.
19. Wang D.D., Kriegstein A.R. // J. Physiol. 2009. V. 587. № 9. P. 1873–1879.
20. Ben-Ari Y. // Epileptic Disord. 2006. V. 8. № 2. P. 91–102.
21. Bregestovski P., Bernard C. // Front. Pharmacol. 2012. V. 3. № 65. 5 p.
22. Zilberter M. // J. Neurosci. 2016. V. 36. № 40. P. 10242–10244.
23. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigoriev I.P. // Eur. J. Histochem. 2015. V. 59. № 3. P. 5–9.
24. Gusel'nikova V.V., Korzhevskii D.E. // Neurosci. Behav. Physiol. 2018. V. 48. № 2. P. 153–156.
25. Greif K.F., Erlander M.G., Tillakaratne N.J.K., Tobin A.J. // Neurochem. Res. 1991. V. 16. № 3. P. 235–242.
26. Shihan M.H., Novo S.G., Le Marchand S.J., Wang Y., Duncan M.K. // Biochem. Biophys. Reports. 2021. V. 25. P. 100916.
27. Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. // Морфология 2015. Т. 147. № 1. С. 78–82.
28. Nakamoto K.T., Mellott J.G., Killius J., Storey-Workley M.E., Sowick C.S., Schofield B.R. // Front. Neuroanat. 2014. V. 8. № 108. P. 1–13.
29. Cesa R., Morando L., Strata P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 48. P. 18988–18993.
30. Peters A. // J. Neurocytol. 2002. V. 31. № 3–5 Spec. Iss. P. 183–193.
31. Lodato S., Arlotta P. // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2015. V. 31. P. 699–720.
32. Feldmeyer D., Qi G., Emmenegger V., Staiger J.F. // Neuroscience. 2018. V. 368. P. 132–151.
33. Tremblay R., Lee S., Rudy B. // Neuron. 2016. V. 91. № 2. P. 260–292.
34. Ascoli G.A., Alonso-Nanclares L., Anderson S.A., Barrioune G., Benavides-Piccione R., Burkhalter A., Buzsáki G., Cauli B., DeFelipe J., Fairén A., Feldmeyer D., Fishell G., Fregnac Y., Freund T.F., Gardner D., Gardner E.P., Goldberg J.H., Helmstaedter M., Hestrin S., Karube F., Kisvárdy Z.F., Lambiez B., Lewis D.A., Marin O., Markram H., Múoz A., Packer A., Petersen C.C.H., Rockland K.S., Rossier J., Rudy B., Somogyi P., Staiger J.F., Tamás G., Thomson A.M., Toledo-Rodríguez M., Wang Y., West D.C., Yuste R. // Nat. Rev. Neurosci. 2008. V. 9. № 7. P. 557–568.
35. Defelipe J., López-Cruz P.L., Benavides-Piccione R., Bielza C., Larrañaga P., Anderson S., Burkhalter A., Cauli B., Fairén A., Feldmeyer D., Fishell G., Fitzpatrick D., Freund T.F., González-Burgos G., Hestrin S., Hill S., Hof P.R., Huang J., Jones E.G., Kawaguchi Y., Kisvárdy Z., Kubota Y., Lewis D.A., Marin O., Markram H., McBain C.J., Meyer H.S., Monyer H., Nelson S.B., Rockland K., Rossier J., Rubenstein J.L.R., Rudy B., Scanziani M., Shepherd G.M., Sherwood C.C., Staiger J.F., Tamás G., Thomson A., Weng Y., Yuste R., Ascoli G.A. // Nat. Rev. Neurosci. 2013. V. 14. № 3. P. 202–216.
36. Mihaljević B., Benavides-Piccione R., Bielza C., Larrañaga P., DeFelipe J. // Sci. data. 2019. V. 6. № 1. P. 221.
37. Favuzzi E., Deogracias R., Marques-Smith A., Maeso P., Jezequel J., Exposito-Alonso D., Balia M., Kroon T., Hinojosa A.J., Maraver E.F., Rico B. // Science. 2019. V. 363. № 6425. P. 413–417.
38. Kohno T., Honda T., Kubo K.I., Nakano Y., Tsuchiya A., Murakami T., Banno H., Nakajima K., Hattori M. // J. Neurosci. 2015. V. 35. № 11. P. 4776–4787.
39. Cheng Q., Yeh P.W.L., Yeh H.H. // Eur. J. Neurosci. 2006. V. 24. № 8. P. 2145–2151.
40. Gonchar Y., Wang Q., Burkhalter A.H. // Front. Neuroanat. 2008. V. 1. P. 3.
41. Wang Y., Toledo-Rodríguez M., Gupta A., Wu C., Silberberg G., Luo J., Markram H. // J. Physiol. 2004. V. 561. № 1. P. 65–90.
42. Imamoto K., Karasawa N., Isomura G., Nagatsu I. // Neurosci. Res. 1994. V. 20. № 1. P. 101–105.
43. Sarnat H.B., Flores-Sarnat L. // Semin. Pediatr. Neurol. 2002. V. 9. № 4. P. 302–308.
44. Chowdhury T.G., Jimenez J.C., Bomar J.M., Cruz-Martin A., Cantle J.P., Portera-Cailliau C. // Front. Neuroanat. 2010. V. 4. № 10. 8 p.
45. Derer P., Derer M. // Neuroscience. 1990. V. 36. № 3. P. 839–856.
46. Jiang X., Wang G., Lee A.J., Stornetta R.L., Zhu J.J. // Nat. Neurosci. 2013. V. 16. P. 210–218.
47. Oláh S., Füle M., Komlósi G., Varga C., Báldi R., Barzó P., Tamás G. // Nature. 2009. V. 461. № 7268. P. 1278–1281.
48. Fedosikhina L.A. // Neurosci. Behav. Physiol. 1986. V. 16. № 4. P. 340–345.
49. Григорьев И.П., Алексеева О.С., Кирик О.В., Суфиева Д.А., Коржевский Д.Э. // Морфология. 2018. Т. 154. № 5. С. 7–12.
50. Naskar S., Narducci R., Balzani E., Cwetsch A.W., Tucci V., Cancedda L. // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 1–12.
51. Molnár Z., Blakemore C. // Trends. Neurosci. 1995. V. 18. № 9. P. 389–397.
52. Behuet S., Cremer J.N., Cremer M., Palomero-Gallagher N., Zilles K., Amunts K. // Front. Neuroanat. 2019. V. 13. № 100. 14 p.
53. Ohara P.T., Granato A., Moallem T.M., Wang B.R., Tillet Y., Jasmin L. // J. Neurocytol. 2003. V. 32. № 2. P. 131–141.
54. Rétaux S., Trovero F., Besson M.-J. // Eur. J. Neurosci. 1994. V. 6. № 12. P. 1782–1791.

55. Kolos E.A., Korzhevskii D.A. // *Neurochem. J.* 2016. V. 10. № 1. P. 47–52.
56. Dávila J.C., Real M.Á., Olmos L., Legaz I., Medina L., Guirado S. // *J. Comp. Neurol.* 2005. V. 481. № 1. P. 42–57.
57. Cobas A., Fairén A., Alvarez-Bolado G., Sánchez M.P. // *Neuroscience.* 1991. V. 40. № 2. P. 375–397.
58. Tochitani S., Kondo S. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. 7 p.
59. Andrews W.D., Barber M., Nemitz M., Memi F., Parnavelas J.G. // *Brain Struct. Funct.* 2017. V. 222. № 5. P. 2217–2233.
60. Al-Sarraf H. // *Dev. Brain Res.* 2002. V. 139. № 2. P. 121–129.
61. Vieira M., Saraiva M.J. // *Biomol. Concepts.* 2014. V. 5. № 1. P. 45–54.

Morphological Changes That Occur in GABAergic Structures of Rat's Forebrain during Postnatal Development

V. A. Razenkova^a and D. E. Korzhevskii^a

^a *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

The aim of the study was to investigate GABAergic neurons and synaptic terminals in early postnatal development and aging. Wistar rat's forebrain slices at different stages of postnatal development (from postnatal day 7 to 24 months) were used. Immunohistochemical detection of GABA synthetic enzyme (glutamate decarboxylase isoform 67 or GAD67) was performed to reveal GABAergic structures. Morphological changes that occur in GABAergic system during postnatal development were described. In particular, it has been shown that synaptic terminals are predominantly localized in cortical layer I in 7-day-old animals. Our findings suggest that Cajal–Retzius cells aren't GABAergic. GABAergic neurons were found in young and old animals in subventricular zone. We established that epithelial layer of choroid plexus contains GAD67 by the end of the first month of postnatal development. In this regard, these epithelial cells may be a source of extrasynaptic GABA, which enters cerebrospinal fluid and then nervous tissue of the brain.

Keywords: gamma-aminobutyric acid, glutamate decarboxylase, development, forebrain, immunohistochemistry, confocal laser microscopy

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 615.21:616.8-00:577.2

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ЭНДОГЕННОЙ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

© 2022 г. И. Ф. Беленичев^{1, *}, Е. Г. Алиева¹, А. М. Камышный²,
Н. В. Бухтиярова¹, В. П. Рыженко¹, Н. О. Горчакова³

¹Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

²Тернопольский государственный медицинский университет, Тернополь, Украина

³Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Киев, Украина

Поступила в редакцию 30.06.2021 г.

После доработки 31.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Пренатальная гипоксия (ПГ) вызывает патологические изменения в головном мозге и может привести к необратимым долгосрочным нарушениям его развития и возникновению психоневрологических патологий у детей. Фармакологическая коррекция постгипоксических нарушений ЦНС является приоритетной проблемой современной медицины. Целью настоящего исследования явилось изучение нейропротективного действия ангиолина, тиотриазолина, тамоксифена, глуторедоксина, цереброкурина, антагониста IL-1b (РАИЛ), мексидола и L-аргинина в сравнении с референс-препаратом пирacetамом по их влиянию на экспрессию факторов эндогенной нейропротекции для дальнейшего обоснования применения их в лечении пренатального поражения ЦНС в модели хронической ПГ. Методами ПЦР в реальном времени и иммуноферментного анализа были изучены экспрессия мРНК HSP₇₀, HIF-1, c-fos и содержание HSP₇₀ в цитоплазматической и митохондриальной фракциях головного мозга крысят на 60е сут жизни, перенесших ПГ. Установлено, что хроническая ПГ приводит к угнетению транскрипционных процессов в нейронах и подавлению синтеза HIF1a, HSP₇₀ и c-fos. Изучаемые препараты способны модулировать HSP₇₀-опосредованные механизмы эндогенной нейропротекции. Наиболее активными среди модуляторов HSP₇₀ в условиях хронической ПГ являются цереброкурин (150 мкл/кг) и ангиолин (50 мг/кг), которые превосходят другие исследуемые препараты по уровню повышения экспрессии мРНК HSP₇₀, мРНК HIF-1a и концентрации белка HSP₇₀ в головном мозге экспериментальных животных и могут рассматриваться в качестве перспективных нейропротективных средств в комплексной терапии после ПГ.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, ЦНС, эндогенная нейропротекция, HSP₇₀, мРНК c-fos, мРНК HSP₇₀, мРНК HIF-1a, модуляторы HSP₇₀

DOI: 10.31857/S1027813322010046

ВВЕДЕНИЕ

Гипоксические повреждения головного мозга занимают ведущее место в структуре перинатальной патологии нервной системы у новорожденных детей, и, несмотря на интенсивность исследований, актуальность данной проблемы не снижается, так как патогенез и этиология остаются во многом неясны, а лечение требует разработки новых лекарственных препаратов [1]. Пренатальная гипоксия (ПГ) и асфиксия являются основными причинами перинатальной смертности, составляя от 20 до 50% в ее структуре [2]. Развивающийся мозг новорожденного чрезвычайно чувствителен к

воздействию гипоксии, которая не только вызывает очаговые повреждения мозговой ткани, но и тормозит ангиогенез, нарушает клеточную дифференцировку [3]. Новорожденные, перенесшие ПГ, отличаются различными клинико-метаболическими, иммунологическими, гормональными расстройствами адаптации к внеутробной жизни, высокой частотой инфекционных заболеваний, психоневрологических нарушений и существенных отклонений развития в последующие годы жизни [2, 4]. Существенный прорыв в изучении молекулярных механизмов функционирования мозга в условиях нормы и патологии осуществлен лишь в последний годы, благодаря успехам молекулярной биологии, нейробиологии и фундаментальной фармакологии [5]. Гипоксическое повреждение ЦНС плода происходит вследствие сни-

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

жения парциального давления кислорода за счет ухудшения маточного кровообращения, плацентарной недостаточности и при заболеваниях плода [5, 6]. Различают механизмы нейродеструкции в период острой ПГ — трансмиттерный аутокоидоз, глутамат-кальциевый каскад, нарушение нитроксидергической системы, энергодефицит, а также в постгипоксический период, который значительно пролонгирован во времени — оксидативный стресс, вторичная митохондриальная дисфункция, нейроапоптоз, нейровоспаление, дефицит нейротрофических и цитопротективных факторов [2, 5, 7]. Эволюцией предусмотрены компенсаторно-приспособительные механизмы системы мать—плацента—плод, повышающие устойчивость ЦНС плода — активация компенсаторных энергетических шунтов, экспрессия факторов эндогенной цитопротекции, генов ответственных за синтез антиоксидантных ферментов, а также факторов регуляции гемокрикуляции [4]. Работами первых десятилетий XXI в. показана роль белков теплового шока (HSP) и фактора индуцированного гипоксией HIF-1 в реализации механизмов эндогенной нейропротекции при гипоксическом поражении мозга [7–10]. В настоящее время с целью нейропротекции после ПГ применяются ноотропы, антигипоксанты, вазоактивные средства [11–19]. Однако их действие не удовлетворяет требованиям клиники. В этой связи, а также основываясь на многочисленных работах сотрудников кафедры фармакологии и медицинской рецептуры Запорожского государственного медицинского университета (ЗГМУ), перспективным направлением нейропротекции после ПГ можно обозначить применение средств, активирующих HSP₇₀ — зависимые механизмы эндогенной нейропротекции. В этом отношении интерес представляют такие лекарственные препараты, как ангиолин, тиотриазолин, тамоксифен, глуторедоксин, цереброкурин, РАИЛ, которые показали свою способность в регуляции экспрессии HSP₇₀ в условиях моделирования ишемии головного мозга, миокарда, хронической алкоголизации [7, 11–16]. Также интересным представилось оценить HSP₇₀ — механизм нейропротективного действия и таких препаратов, как L-аргинин, мексидол и пирацетам, обладающих различными механизмами цитопротективного и противоишемического действия [17–19].

Цель исследования — оценить влияние ангиолина, тиотриазолина, тамоксифена, глуторедоксина, цереброкурина, РАИЛ, мексидола, L-аргинина и референсного препарата пирацетама на экспрессию факторов эндогенной нейропротекции и экспериментально обосновать перспективность дальнейшего изучения средств — модуляторов этой системы в качестве компонентов комплексного лечения пренатального гипоксического поражения ЦНС.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика лабораторных животных и экспериментальной модели ПГ. Опыты проведены на 50 аутбредных белых нелинейных самках и 10 самцах крыс, массой 220–240 г. в возрасте 4.5 мес., полученных из питомника ГУ “Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины”. Крысы содержались в стандартных условиях вивария: температура — 20–25°C, относительная влажность — 50–55%, естественное освещение, рацион, рекомендуемый для этого вида лабораторных животных, питьевой режим “ad libitum”. Экспериментальную часть исследования выполняли в строгом соответствии с национальными “Совместными этическими принципами экспериментов на животных” (Украина, 2001), согласованными с положением Совета 2010/63EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. по защите животных, используемых в научных целях, (Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). В работе использовали модель хронической гемической нитрит-индуцированной ПГ [20, 21]. Для фиксации беременной самки виргинным самцам подсаживали половозрелых самцов из расчета два самца на четыре самки. Отсчет срока беременности крыс осуществляли с момента обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке (1-й день беременности). Моделирование гемической гипоксии осуществляли в пренатальном периоде развития путем введения внутрибрюшинно беременным самкам крыс раствора нитрита натрия ежедневно с 16-го по 21-й день беременности в дозе 50 мг/кг (доза, вызывающая гипоксию средней тяжести) [20]. Для контроля беременным самкам вводили физиологический раствор в том же режиме. Потомство было разделено на группы: I — здоровые животные, полученные от самок с нормальной физиологической беременностью, которым вводили физиологический раствор; II — контрольная группа крысят, после моделирования ПГ, которым ежедневно вводили физиологический раствор; III–XI группы потомства крыс после моделирования ПГ, которым ежедневно с 1-го по 30 день жизни вводили лекарственные препараты.

Обоснование выбора лекарственных препаратов и их характеристики. Нами были выбраны лекарственные препараты с экспериментально доказанной способностью модулировать экспрессию HSP₇₀:

1. Тиотриазолин (морфолиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты) (2.5% раствор для инъекций, “Артериум”, Украина), метаболитотропный кардиопротектор и антиоксидант. Имеются данные, что препарат увеличивает экспрессию HSP₇₀ в миокарде при ишемии,

хронической сердечной недостаточности и алкогольном поражении сердца [11].

2. Тамоксифен (таблетки, Финляндия, на их основе экстенпорально приготовлен интраназальный гель (1 мг/1 мл) на кафедре технологии лекарственных средств ЗГМУ) в низких дозах — агонист β эстрогеновых рецепторов (β -ER). Способен повышать концентрацию HSP₇₀ в митохондриях и цитозоле головного мозга и миокарда при острой ишемии за счет регуляции механизмов, в которые вовлечены активные формы кислорода и восстановленный глутатион (АФК/GSH-зависимые механизмы) [12].

3. Ангиолин ([(S) -2,6—диаминогексановой кислоты 3-метил-1,2,4-триаза-5-тиоацетат) (субстанция, НПО “Фарматрон”, Украина), противоишемическое, эндотелиопротективное средство. Повышает экспрессию HSP₇₀ в митохондриях и цитозоле головного мозга и миокарда при острой и хронической ишемии, алкогольной болезни. Также в ответ на ишемию нормализует экспрессию гена раннего реагирования (c-fos) и васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) [13].

4. Глуторедоксин (Сигма—Олдридж, США). Полученные ранее данные свидетельствуют, что глуторедоксин влияет на GSH-зависимые механизмы экспрессии HSP₇₀ в митохондриях и цитозоле головного мозга при острой церебральной ишемии [14].

5. Цереброкурин (раствор для инъекций, НПО “НИР”, Украина). Цереброкурин содержит нейропептиды, белки S-100, рилин, фактор роста нервов (NGF) (не менее 2 мг/мл) и аминокислоты. Проявляет выраженное нейропротективное действие, повышает пластичность нейронов, стимулирует экспрессию транскрипционных факторов, а также защитных белков, в том числе HSP [15].

Также в качестве перспективных средств нейропротекции изучались:

6. РАИЛ — селективный антагонист IL-1b (субстанция предоставлена Федеральным государственным унитарным предприятием “Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биологических препаратов” (Россия, Санкт-Петербург, ЛСР-007452/1-0300710). Субстанция получена биотехнологически из *E. coli* TG1 (pTAC-hIL-1ra), в своей структуре содержит 153 фрагментов аминокислот. Молекулярная масса 17, 906 кДа. Интраназальный РАИЛ-гель (5 мг/1 мл) разработан на кафедре технологии лекарственных средств ЗГМУ). РАИЛ прерывает IL-1b — зависимые каскадные механизмы ишемической нейродеструкции [16]. Имеются данные, что РАИЛ нормализует глутатион (GSH)-зависимые механизмы экспрессии HSP₇₀ в митохондриях и цитозоле головного мозга при острой ишемии [22].

7. L-аргинин (42% раствор для инъекций во флаконе, Тивортин, Юрия-фарм, Украина) — прекурсор NO, снижает нарушения в нитроксидергической системе при ишемии, проявляет эндотелиотропное, антиоксидантное действие [17].

8. Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипирида сукцинат, раствор для инъекций, 50 мг/мл, НПК “Фармасофт”, “Эллара”, Россия. Антиоксидант с нейропротективными свойствами. Тормозит механизмы ишемической нейродеструкции, в которых нераспространенное участие принимают активные формы кислорода (АФК — зависимые механизмы) [18].

9. В качестве референс-препарата был отобран пирацетам (200 мг/мл, АТ “Фармак”, Украина). Пирацетам — ноотропное средство с выраженным противоишемическим действием [19]. Выбор пирацетама в качестве референсного препарата обусловлен тем, что доклиническими исследованиями достаточно полно изучен молекулярно-биохимический механизм ноотропного, нейропротективного и противоишемического действия данного лекарственного средства, имеется доказательная база его клинической эффективности [2, 7]. Пирацетам включен в протоколы ведения больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения, черепно-мозговыми травмами, а также с фетоплацентарной недостаточностью и пренатальной энцефалопатией Украины, Российской Федерации, США и Евросоюза в качестве базового средства нейропротекции [7, 19].

Препараты вводили по следующей схеме — пирацетам 500 мг/кг, в/б, ангиолин 50 мг/кг, в/б, тиотриазолин 50 мг/кг, в/б, мексидол — 100 мг/кг, в/б, L-аргинин 200 мг/кг, в/б, глуторедоксин 200 мкг/кг, в/б, тамоксифен 0.1 мг/кг, интраназально, РАИЛ 1 мг/кг, интраназально, цереброкурин — 150 мкл/кг, в/б. При подборе дозировки использовались инструкции к препаратам и результаты наших предыдущих исследований [7, 11, 13, 22].

Крыс выводили из эксперимента на 60 сут жизни под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Для исследований брали кровь из брюшной артерии и мозг. С головного мозга быстро удаляли кровь, отделяли от мозговой оболочки и исследуемые кусочки помещали в жидкий азот. Затем измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды при 2°C, содержащий (в ммоль): сахаразы — 250, трис-HCl-буфера — 20, ЭДТА — 1 (pH 7.4). При температуре (+4°C) методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Sigma 3-30k (Германия) выделяли митохондриальную фракцию. Головной мозг экспериментальных животных помещали на сутки в фиксатор Буэна и после стандартной гистологической проводки ткань заключали в парапласт. Для проведения ПЦР на ротационном мик-

ротоме изготавливали срезы V–VI слоя сенсомоторной коры толщиной 5 микрон. Способность позитивно модулировать механизмы эндогенной нейропротекции у исследуемых лекарственных средств оценивалась по экспрессии и концентрации HSP₇₀, а также по экспрессии HIF-1 и c-fos. Одним из нейропротективных эффектов HSP₇₀ является пролонгирование “времени жизни” HIF-1, который в условиях гипоксии способен активировать и регулировать компенсаторные цитозольно-митохондриальные шунты (в частности, малат-аспартатный) [7]. Фактор транскрипции c-fos (иногда в литературе его называют геном раннего реагирования) быстро и временно активируется в ответ на воздействия самого широкого спектра, в том числе и на гипоксию, и способен, в зависимости от выраженности экспрессии, участвовать в процессах от апоптоза до нейропротекции, запуская транскрипцию HSP₇₀ [42].

ПЦР в реальном времени. Экспрессию мРНК HSP₇₀, HIF-1, c-fos определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Ткани депарафинировали путем инкубации в двух следующих друг за другом ванн ксилолов и 100% этанола. После депарафинирования и центрифугирования, осадок высушивали на воздухе для удаления остатков этанола. Выделение тотальной РНК из ткани крыс проводили с использованием набора “Trizol RNA Prep 100” (“Изоген”, Россия), который содержит следующие реагенты: Trizol reagent и ExtraGene E. РНК выделяли в соответствии с протоколом набора. Для обратной транскрипции (синтез до ДНК) использовали “Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ-1)” (“Синтол”, Россия). Для определения уровня экспрессии исследуемых генов использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) и набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green R-402 (“Синтол”, Россия). Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемых и референс-генов были подобраны с помощью программного обеспечения Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой ThermoScientific, США. Регистрация интенсивности флуоресценции происходила автоматически в конце стадии элонгации каждого цикла по каналу автоматически SybrGreen. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов был использован ген actin, beta (Actb).

Иммуноферментный анализ. Принцип метода основан на твердофазной энзим-связанной иммуносорбции по принципу “сэндвича”. Уровень белка теплового шока HSP₇₀ определяли в цитоплазматической и митохондриальной фракциях

головного мозга иммуноферментным методом, используя набор AMP'D® HSP70 high sensitivity ELISA kit, Enzo (Швеция). Концентрацию HSP₇₀ выражали в нг/мл.

Статистические методы. Статистическая обработка данных научных исследований проводилась с использованием пакета программ “Statistica® for Windows 6.0” (StatSoft Inc., № AXXR712D833214-FAN5), а также “SPSS 16.0”, “Microsoft Office Excel 2010”. Перед применением статистических критериев проводилась проверка гипотезы о нормальном законе распределения случайных величин (по критерию Shapiro–Wilk и Колмогорова–Смирнова). В условиях нормального распределения достоверность межгрупповых различий устанавливалась с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента. В случае, когда данные не соответствовали законам нормального распределения, сравнительный анализ проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Для сравнения независимых переменных в более чем двух выборках применяли дисперсионный анализ (ANOVA) при нормальном распределении или критерий Kruskal–Wallis для распределения, отличного от нормального. Для анализа закономерностей связи между отдельными показателями проведен корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Пирсона или Спирмена. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия $p < 0.05$ (95%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя данные, представленные на рис. 1, характеризующие экспрессию HIF-1 α , мРНК HSP₇₀ и мРНК c-fos в сенсомоторной коре головного мозга крысят на 60 сутки жизни, перенесших ПГ, было установлено, что экспрессия мРНК HIF-1 α в группе не леченых крыс (контроль) была на 67% ниже по сравнению с интактной группой. Также было зарегистрировано снижение экспрессии мРНК HSP₇₀ на 59% и мРНК c-fos на 72%. Методом иммуноферментного анализа было установлено снижение концентрации HSP₇₀ на 26% в митохондриях и почти в 2 раза в цитозоле головного мозга крысят после перенесенной ПГ по сравнению со здоровыми животными аналогичного возраста (рис. 2). Выявленные факты свидетельствуют об угнетении транскрипционных процессов в нейронах и подавлении HSP₇₀-зависимых механизмов эндогенной нейропротекции.

Курсовое 30-суточное лечение отобранными лекарственными препаратами оказывало различное по выраженности действия влияние на экспрессию мРНК HIF-1 α , мРНК HSP₇₀ и мРНК c-fos, а также на концентрацию HSP₇₀ в головном мозге крысят, перенесших ПГ.

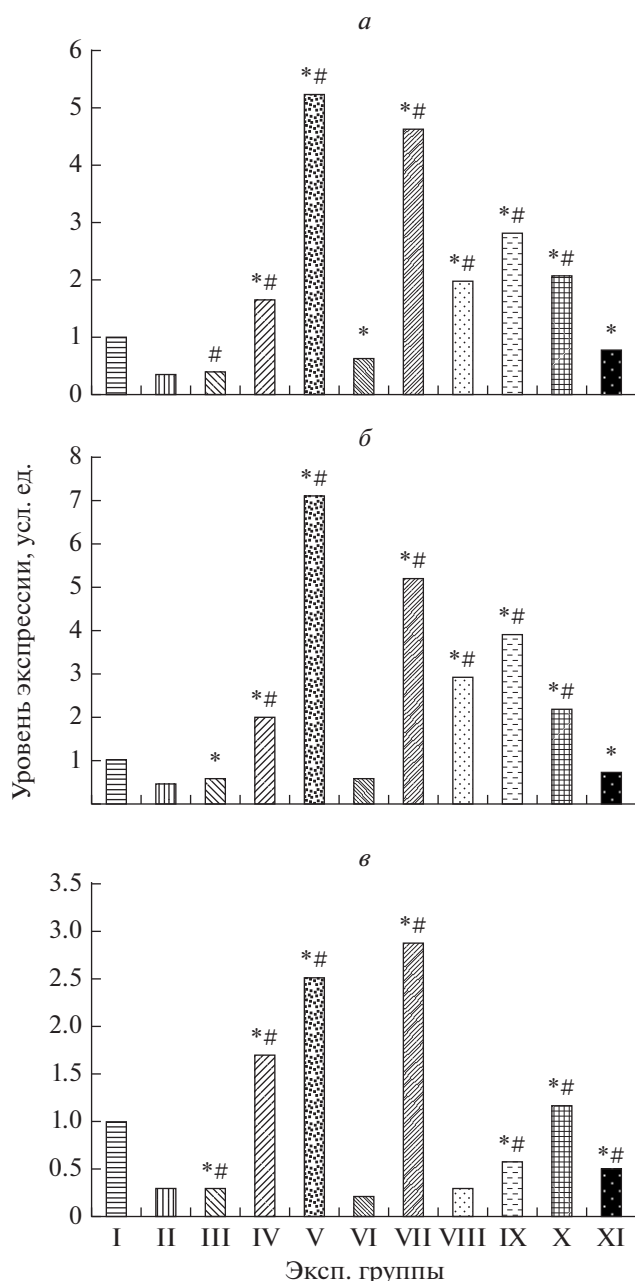


Рис. 1. Характер экспрессии мРНК HIF-1 α (а), мРНК HSP₇₀ (б) и мРНК c-fos (в) в сенсомоторной коре головного мозга крыс, перенесших пренатальную гипоксию, после постнатальной 30-суточной фармакологической коррекции на 60 день жизни ($M \pm m$). Экспериментальные группы: I – здоровые животные (интакт), $n = 10$; II – животные, перенесшие ПГ (контроль), $n = 10$; III – ПГ + L-аргинин (200 мг/кг), $n = 10$; IV – ПГ + тамоксифен (0.1 мг/кг), $n = 10$; V – ПГ + цереброкурин (150 мкл/кг), $n = 10$; VI – ПГ + пирацетам (500 мг/кг), $n = 10$; VII – ПГ + ангиолин (50 мг/кг), $n = 10$; VIII – ПГ + РАИЛ (1 мг/кг), $n = 10$; IX – ПГ + глуторедоксин (200 мкг/кг), $n = 10$; X – ПГ + тиотриазолин (50 мг/кг), $n = 10$; XI – ПГ + мексидол (100 мг/кг), $n = 10$. Примечание: * достоверные различия с контрольной группой (ПГ), $p < 0$, # достоверные различия с контрольной группой пирацетама $p < 0.05$.

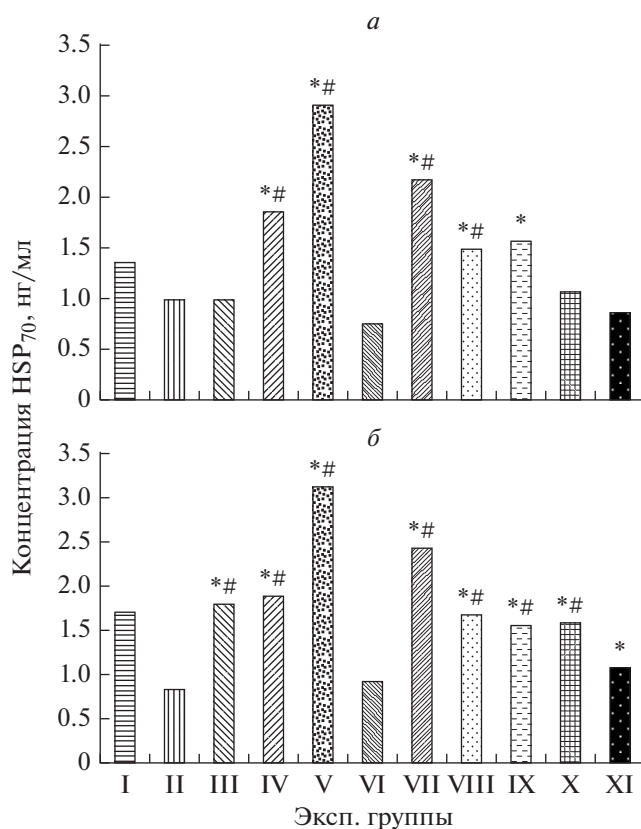


Рис. 2. Количественные показатели содержания HSP70 в митохондриальной (а) и цитозольной (б) фракциях гомогената головного мозга крыс, перенесших пренатальную гипоксию, после постнатальной 30-суточной фармакологической коррекции на 60 день жизни ($M \pm m$). Экспериментальные группы: I – здоровые животные (интакт), $n = 10$; II – животные, перенесшие ПГ (контроль), $n = 10$; III – ПГ + L-аргинин (200 мг/кг), $n = 10$; IV – ПГ + тамоксифен (0.1 мг/кг), $n = 10$; V – ПГ + цереброкурин (150 мкл/кг), $n = 10$; VI – ПГ + пирацетам (500 мг/кг), $n = 10$; VII – ПГ + ангиолин (50 мг/кг), $n = 10$; VIII – ПГ + РАИЛ (1 мг/кг), $n = 10$; IX – ПГ + глуторедоксин (200 мкг/кг), $n = 10$; X – ПГ + тиотриазолин (50 мг/кг), $n = 10$; XI – ПГ + мексидол (100 мг/кг), $n = 10$. Примечание: * достоверные различия с контрольной группой (ПГ), $p < 0$, # достоверные различия с контрольной группой пирацетама $p < 0.05$.

Исследования экспрессии мРНК HIF-1 α показало, что во всех группах, кроме животных, получавших L-аргинин, уровень синтеза белка HIF-1 α выше контрольных значений (тамоксифен в 4.9 раз, цереброкурин – в 15.8 раз, пирацетам – на 82%, ангиолин – в 13.9 раз, РАИЛ – в 6 раз, глуторедоксин – в 8.5 раз, тиотриазолин – в 6.2 раза, мексидол – в 2.3 раза). Показатели экспрессии мРНК HIF-1 α у животных после введения цереброкурина и ангиолина являются максимальными и достоверно ($p < 0.05$) превышают показатели всех экспериментальных групп, а уровень экспрессии

мРНК HIF-1 α у животных, получавших L-аргинин, не отличаются от показателей контроля.

Изменения в уровне экспрессии мРНК HSP₇₀ после применения лекарственных препаратов в целом соответствует показателям мРНК HIF-1 α . Большинство препаратов вызывает существенное увеличение этого показателя (тамоксифен в 4.8 раз, цереброкурин — в 17.4 раза, ангиолин — в 12.7 раз, РАИЛ — в 7 раз, глуторедоксин — в 9.5 раз, тиотриазолин — в 5.2 раза). Применение L-аргинина, мексидола и пирацетама демонстрирует незначительное (в сравнении с другими препаратами) повышение уровня экспрессии мРНК HSP₇₀ (на 39, 37.7, и 66% соответственно), а применение цереброкурина и ангиолина, как и в исследовании экспрессии мРНК HIF-1 α , характеризуется максимальными значениями среди всех исследуемых препаратов (рис. 1а).

Применение исследуемых лекарственных препаратов приводит к увеличению показателей уровня экспрессии мРНК c-fos в сенсомоторной коре головного мозга крыс в большинстве экспериментальных групп (тамоксифен — в 6 раз, цереброкурин — в 9 раз, ангиолин — в 10 раз, глуторедоксин — в 2 раза, тиотриазолин — в 4 раза, мексидол — на 75%). Применение L-аргинина и РАИЛ не вызывало достоверных изменений уровня экспрессии мРНК c-fos, а курсовое введение пирацетама привело к снижению данного показателя на 25%.

Показатели концентрации HSP₇₀ в цитозольной фракции гомогената головного мозга крыс экспериментальных групп в целом коррелируют со значениями уровня экспрессии мРНК этого белка. Так, введение ангиолина и цереброкурина приводит к увеличению концентрации HSP₇₀ в цитозоле в 3 и 3.8 раза соответственно, а применение пирацетама и мексидола демонстрируют минимальные значения. Показатели остальных препаратов достоверно выше контрольной группы в 1.9–2.3 раза (рис. 2б).

Характер изменения концентрации HSP₇₀ в митохондриальной фракции в группах животных после ПГ, получавших лечение исследуемыми препаратами, демонстрирует разнонаправленность их воздействия. Так, показатели концентрации HSP₇₀ в митохондриях нейронов головного мозга животных, получавших L-аргинин и тиотриазолин не отличаются от показателей не леченных животных, а в группах после лечения пирацетамом и мексидолом незначительно снижаются (на 24% и 14% соответственно). Курсовое введение тамоксифена увеличило концентрацию митохондриального HSP₇₀ на 85%, РАИЛ — на 48% и глуторедоксона — на 57% (рис. 2а). Как и по другим исследуемым показателям, максимальные значения концентрации HSP₇₀ в митохондриальной фракции демонстрируют препараты цереброкурин и

ангиолин (в 2.4 и в 2.2 раза выше контрольных значений).

Можно предположить, что в механизме развития нейродеструктивных нарушений и последующего когнитивного дефицита у крыс после ПГ существенная роль принадлежит подавлению экспрессии гена раннего реагирования c-fos, что связано с его транскрипционной ролью в синтезе регуляторных белков, участвующих в механизмах эндогенной нейропротекции, ангиогенеза, консолидации памяти [5, 7]. Данное предположение подтверждается и опытами других исследователей, в которых показано, что в инициации механизмов эндогенной нейропротекции определенную роль играют факторы транскрипции (c-fos и c-jun), которые запускают экспрессию генов белков теплового шока (HSP₇₀ и HSP₇₂), а также фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1) [23, 24]. Продукты c-fos генов играют решающую роль в контроле над клеточным циклом, развитием, ростом и клеточной дифференцировкой, а также определяют судьбу дифференцированных нейронов, участвуют в передаче информации от клетки к клетке. При срыве адаптационных возможностей организма, резкого увеличения АФК и дефицита восстановленных тиолов, происходит инaktivация факторов транскрипции с последующим подавлением экспрессии генов c-fos [23]. Известно, что подавление трансляции мРНК c-fos в структурах мозга нарушает кратковременную память на различных моделях обучения у разных видов животных [24]. Таким образом, выше представленные экспериментальные исследования позволяют сделать предположение, что ген c-fos является тем самым “мостиком”, через который индивидуальный опыт животного вступает во взаимодействие со всем генетическим аппаратом [25, 26]. Однако, и усиление экспрессии гена c-fos не выполняет физиологическую функцию. В случае, когда экспрессия гена усиливается более чем в 20 раз, c-fos уже играет отрицательную роль. Гиперэкспрессия гена c-fos, как было отмечено в CA1 гиппокампе крысят на 1–14 сут жизни после перенесенной ПГ, приводит к значительному повышению содержания в клетках белка c-fos, который непосредственно участвует в процессе фрагментации ДНК и иницировании процессов апоптотической гибели клетки [5, 27]. Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что активация гена c-fos происходит при любых воздействиях на клетку. Характер экспрессии гена будет определять дальнейшую судьбу клетки: либо в ней будут активироваться трансляционные, транскрипционные процессы, синтез пластических материалов, либо она апоптотически погибнет.

Индуктируемые гипоксией транскрипционные факторы (Hypoxia-inducible factor, HIFs) являются одним из приспособительных механизмов, активированных во время гипоксии/ишемии. Гипо-

ксия стабилизирует HIF-1 субъединицу, которая связывается с HIF-1 α субъединицей и индуцирует транскрипцию генов-мишеней, регулирующих кислородный гомеостаз. Некоторые из этих генов, ассоциированных с регулированием HIF-1, включают эритропоэтин, играющий важную роль в выживании клеток, фактор роста эндотелия сосудов, который активирует эндотелиальные клетки и способствует капиллярному прорастанию [5, 28, 29], и транспортер глюкозы-1 (Glut-1), который влияет на клеточный метаболизм глюкозы [7]. HIF играет решающую роль в стимулировании ангиогенеза и метаболической адаптации в процессе развития головного мозга. Экспрессия гена HIF-1 зависит не только от гипоксии, но и других регулирующих факторов, в том числе генетически обусловленных, и поэтому не всегда может быть адекватной гипоксическому воздействию. В этом случае, а также когда гипоксия/ишемия действует длительно и чрезмерно, может развернуться каскад транскрипционных и эпигенетических реакций и опосредованных ими структурно-метаболических сдвигов, которые могут знаменовать собой перепрограммирование с высокой готовностью к перинатальному поражению ЦНС [8].

Исследованиями последнего десятилетия показана способность белков теплового шока (HSP₇₀) проявлять защитное действие при ишемических поражениях мозга и сердца [7, 30]. Нейропротекторное действие HSP₇₀ обнаружено в условиях оксидативного и нитрозирующего стрессов, глутаматной эксайтотоксичности, при депривации глюкозы и кислорода, а также на различных моделях ишемии головного мозга [11, 14, 31]. Повышение HSP₇₀ в тканях мозга свидетельствует об активации механизмов эндогенной нейропротекции, а его дефицит о преобладании механизмов нейродегенерации. Кроме того, в последнее время появились данные о роли HSP₇₀ в стабилизации HIF-1 — белка, который в условиях ишемии отвечает за экспрессию генов, продукты которых участвуют в процессах пролиферации, апоптоза, стабилизации белковых молекул в условиях оксидативного стресса, инициации фолдинга окислительно модифицированных функционально активных макромолекул [5, 7, 32]. Принимая во внимание данные о способности HSP₇₀ усиливать жизнеспособность нейронов в условиях гипоксии и факт однонаправленного изменения содержания в тканях головного мозга HSP и HIF-белков, можно предположить, что HSP₇₀ участвует в регуляции сигнальных путей ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF-белка [7], что подтверждалось проведенными нами исследованиями [5, 7, 16, 22]. Полученные результаты не противоречат данным других исследователей, которыми было показано регу-

лирующее влияние HSP₇₀ на процессы митохондриальной дисфункции, оксидативного стресса, экспрессию HIF-белков в клетках головного мозга при ишемии и гипоксии [6, 9, 27].

Пирацетам, который играет особую роль по влиянию на обменные процессы и кровообращение мозга плода, что обуславливает возможность его использования с целью лечения последствий ПГ в ЦНС. Препарат стимулирует окислительно-восстановительные реакции, усиливает утилизацию глюкозы, улучшает регионарный кровоток в ишемизированных участках мозга. Пирацетам повышает энергетический потенциал организма за счет ускорения оборота АТФ. Улучшение энергетических процессов под его влиянием повышает устойчивость к гипоксии [19, 33]. Однако, пирацетам имеет ряд побочных эффектов: у детей до года на фоне гипоксии в ЦНС он может спровоцировать судорожную реакцию и усилить лактацидоз [2]. Известные механизмы противоишемического действия пирацетама не раскрывают в полной мере его влияние на изучаемые звенья механизма эндогенной нейропротекции. L-аргинин, являясь прекурсором NO, проявляет эндотелиопротективные, вазодилатирующие, антиоксидантные свойства, которые обеспечивают ему некоторую эффективность при угрозе невынашивания, задержке роста плода и фетоплацентарной недостаточности [2]. Однако, как демонстрируют наши исследования, восстановление продукции NO не влияет на экспрессию HSP₇₀, хотя и имеются исследования о NO — регуляции HSP₇₀ [7, 34]. Возможно, это связано с быстрым превращением NO в пероксинитрит при ишемии и потерей его физиологических функций [35].

Определенный успех в лечении последствий ПГ внесло применение антиоксидантов нейропротекторов — мексидола и тиотриазолина. Мексидол тормозит окислительную модификацию белков, нуклеиновых кислот и фосфолипидов, являясь сквенджером кислородных радикалов и радикалов жирных кислот, сохраняет физико-химические константы фосфолипидного бислоя мембраны [18, 36]. Мексидол проявляет цереброваскулярное действие за счет снижения окислительного повреждения рецепторов ГАМК-рецепторов сосудов головного мозга [36]. Мексидол позитивно влияет на энергетический обмен новорожденных после ПГ и ускоряет восстановление двигательных функций [37]. Однако, свойства “прямого” антиоксиданта не обеспечивают мексидолу полноценного влияния на HSP₇₀-зависимые механизмы эндогенной нейропротекции. Тиотриазолин уменьшает образование АФК в митохондриях, сохраняя окислительную продукцию энергии. Тиотриазолин, снижая гиперпродукцию NO и АФК, предупреждает окислительную модификацию белковых структур рецепторов, ионных каналов, ферментов,

факторов транскрипции (регулирует SH/SS-механизмы экспрессии при ишемии, ядерный транскрипционный фактор-каппа В (NF- κ B)) и восстанавливает экспрессию редокс-чувствительных генов, которые необходимы для защиты клеток от токсических эффектов оксидативного стресса, в том числе и HSP₇₀ [7, 11, 38]. Использование тиотриазолина у первородящих старше 30 лет с угрозой прерывания беременности обеспечивает существенное уменьшение частоты осложнений беременности и родов, улучшает состояние (по шкале Апгар) и адаптацию новорожденных [2].

Выявленные нами выраженные свойства цереброкурина активировать синтез HSP и HIF-белков, объясняется, по нашему мнению, во-первых, их способностью модулировать в условиях гипоксии ответ генома, активируя при этом глобальные факторы транскрипции, запускающие синтез HSP [39]. Во-вторых, в ряде работ показана способность нейропептидов напрямую связываться с HSP-белками и в таком виде презентировать их дендритным клеткам [5, 7]. Кроме того, цереброкурин, как и ряд других нейропептидных препаратов, обладает выраженной антиоксидантной активностью, что обусловлено способностью нейропептидов позитивно воздействовать на экспрессию генов, кодирующих синтез одних из основных ферментов антиоксидантной системы — каталазы и супероксиддисмутазы [15]. Данное свойство исследуемых препаратов, позволяет угнетать окислительную деструкцию самого HSP₇₀-белка в условиях интенсификации процессов свободно-радикального окисления, что пролонгирует его протекторное действие.

Выраженное действие на HSP₇₀-механизмы эндогенной нейропротекции выявлено в данном исследовании у ангиолина. Ангиолин проявляет значительное противоишемическое, нейропротективное, кардиопротективное, эндотелиопротективное действие, которые обеспечиваются его следующими механизмами. Во-первых, за счет антиоксидантного механизма (скавенджер АФК и NO) ангиолин оказывает позитивное действие на экспрессию генов, кодирующих синтез супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы [7, 13], осуществляет регуляцию АФК/GSH-зависимых механизмов экспрессии HSP₇₀, способствует повышению биодоступности NO [7, 40]. Во-вторых, ангиолин в условиях ишемии способен активировать компенсаторные цитозольно-митохондриальные шунты энергии. И, в-третьих, ангиолин, за счет входящего в его состав остатка L-лизина, повышает аффинитет ГАМК рецепторов и снижает эксайтотоксичность [41].

Нейропротективная активность селективного модулятора эстрогеновых рецепторов — тамоксифена обусловлена, по нашему мнению, его активацией β -эстрогеновых рецепторов головного

мозга и последующим отсоединением от последних HSP₇₀. Механизм данного взаимодействия объясняется способностью HSP₇₀ образовывать комплексы с эстрогеновыми рецепторами, не связанными с эстрогенами, для поддержания их в неактивном состоянии [7, 40, 42]. При взаимодействии же эстрогенового рецептора со стероидным лигандом, происходят конформационные изменения белка-рецептора и высвобождение из комплекса белка HSP, вхождение его внутрь клетки и митохондрии для реализации нейропротективного действия. Также, некоторыми исследователями была выдвинута гипотеза о способности селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (SERM) усиливать экспрессию HSP за счет стимулирующего влияния на белковый фактор транскрипции — фактор теплового шока (FHS) [43, 44]. Кроме того, тамоксифен способен ограничивать развитие оксидативного и нитрозильного стрессов на фоне повышения глутатиона, восстанавливая тем самым, тиол-дисульфидное равновесие в нервных клетках [42].

Нейропротективный эффект применения РАИЛ обусловлен его способностью прерывать IL-1b-зависимую экспрессию iNOS и последующее инициирование NO-обусловленных механизмов нейродеструкции. РАИЛ оказывает позитивное действие и на показатели тиол-дисульфидной системы и HSP₇₀. Возможно, РАИЛ через повышение уровня HSP₇₀ на фоне активации редокс-чувствительных факторов транскрипции AP-1, NF- κ B, NF-1, приводит к повышению экспрессии генов глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы, а также генов синтеза ферментов, которые обеспечивают стабильность внутриклеточной концентрации глутатиона восстановленного (γ -глутамилтрансферазы, γ -глутамилцистеинсинтетазы) за счет его синтеза *de novo* [16].

ВЫВОДЫ

1. Хроническая ПГ приводит к угнетению транскрипционных процессов в нейронах и подавлению синтеза HIF1 α , HSP₇₀ и c-fos, что свидетельствует о нарушении механизмов эндогенной нейропротекции.

2. Введение лекарственных препаратов (пирacetам 500 мг/кг, в/б, ангиолин 50 мг/кг, в/б, тиотриазолин 50 мг/кг, в/б, мексидол — 100 мг/кг, в/б, L-аргинин 200 мг/кг, в/б, глуторедоксин 200 мкг/кг, в/б, тамоксифен 0,1 мг/кг, интаназально, АРИЛ 1 мг/кг, интаназально, цереброкурин — 150 мкл/кг, в/б) с 1 по 30 сут жизни крысам после пренатального воздействия хронической гипоксии, оказывает в разной степени выраженности влияние на экспрессию мРНК HIF-1 α , мРНК HSP₇₀ и мРНК c-fos, а также на концентрацию HSP₇₀ в головном мозге экспериментальных животных, что свиде-

тельствует о способности изучаемых препаратов модулировать HSP₇₀-опосредованные механизмы эндогенной нейропротекции.

3. Наиболее активными по способности воздействия на HSP₇₀ — зависимые механизмы эндогенной нейропротекции среди изучаемых средств в условиях моделирования хронической ПГ являются цереброкурин (150 мг/кг) и ангиолин (50 мг/кг), которые превосходят другие исследуемые препараты по уровню повышения экспрессии мРНК HSP₇₀, мРНК HIF-1α и концентрации белка HSP₇₀.

4. Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием для дальнейшего изучения исследуемых препаратов, особенно ангиолина и цереброкурина, в качестве перспективных нейропротективных средств в комплексной терапии поражений ЦНС после хронической ПГ у новорожденных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семина В.И., Степанова Ю.А. // Медицинская визуализация. 2015. № 2. С. 95–105.
2. Резниченко Ю.Г., Беленичев И.Ф., Риженко О.И., Горчакова Н.О., Резниченко Н.Ю. // Перинатальні ураження нервової системи. Запоріжжя: Просвіта, 2020. 364 с.
3. Каркашадзе Г.А., Савостьянов К.В., Макарова С.Г., Намазова-Баранова Л.С., Маслова О.И., Яцык Г.В. // Вопросы современной педиатрии. 2016. Т. 15. № 5. С. 440–451.
4. Афанасьева И.А., Кириченко М.А., Юзва А.А., Хайтович Н.В. // Міжнародний журн. педіатрії, акушерства та гінекології. 2017. Т. 11. № 1. С. 24–28.
5. Беленичев И.Ф., Алиева О.Г. // Фармакологія та лікарська токсикологія, 2019. Т. 13. № 4. С. 235–248.
6. Соколова Н.А., Граф А.В., Маслова М.В., Маклакова А.С., Хиразова Е.Э. // Стресс на ранних стадиях онтогенеза: пептидергическая коррекция. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016. 255 с.
7. Беленичев И.Ф., Черний В.И., Бухтиярова Н.В., Горчакова Н.А. // Нейропротекция и нейропластичность. Киев: Логос, 2015. 512 с.
8. Tang L.Q., Ringstedt T., Pequignot J., Lagercrantz H. // Brain Res. 2000. V. 852(1). P. 84–91.
9. Lee W.B., Kwon S.H., Kim H.M. // Clin. Exp. Pediatr. 2000. V. 43(3). P. 386–394.
10. Ветровой О.В., Нимирицкий П.П., Тюлькова Е.И., Рыбникова Е.А. // Нейрохимия. 2020. Т. 37. № 3. С. 228–232.
11. Беленичев И.Ф., Визир В.А., Мамчур В.И., Курята А.В. // Запорожский медицинский журн. 2019. Т. 21. № 1(112). С. 119–128.
12. Богуш Т.А., Полежаев Б.Б., Дудко Е.А., Богуш Е.А., Кирсанов В.Ю., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.И. // Антибиотики и химиотерапия. 2016. Т. 61. № 3–4. С. 41–49.
13. Чекман І.С., Казакова О.О., Мазур І.А., Нагорна О.О., Беленичев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтиярова Н.В., Сирова Г.О., Довгань Р.С., Загородний М.І. // Допов. Нац. акад. наук Укр. 2017. № 8. С. 86–93.
14. Беленичев И.Ф., Литвиненко Е.С. // Фармакологія та лікарська токсикологія. 2017. Т. 55. № 4–5. С. 20–26.
15. Моргуницова С.А. // Запорожский медицинский журн. 2014. Т. 86. № 5. С. 36–40.
16. Belenichev I.F., Burlaka B.S., Bukhtiyarova N.V., Aliyeva E.G., Suprun E.V., Ishchenko A.M., Simbirtsev A.S. // Neurochemical J. 2021. № 1(15). P. 30–36.
17. Свиридова Н.К., Жільова Н.О. // Східно-Європейський неврологічний журн. 2017. Т. 13. № 1. С. 4–8.
18. Чуканова Е.И., Чуканова А.С. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2019. Т. 119. № 9. С. 39–45.
19. Востриков В.В. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017. Т. 15. № 1. С. 14–25.
20. Черкасова Д.У., Магомедгаджиева Д.Н., Рабаданова А.И. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2009. Т. 11. № 1(5). С. 934–937.
21. Заднипрный И.В., Сатаева Т.П. // Сб. мат. межд. науч. конф. АГМУ. Астрахань, 2017. С. 66–67.
22. Горбачева С.В., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И. // Фармакологія та лікарська токсикологія. 2016. Т. 47. № 1. С. 24–30.
23. Tang L.Q., Ringstedt T., Pequignot J., Lagercrantz H. // Brain Res. 2000. V. 852(1). P. 84–91.
24. Sun Hak Kwon, Heng Mi Kim // Clin Exp. Pediatr. 2000. V. 43(3). P. 386–394.
25. Абрамов А.В., Шаменко В.А. Колесник Ю.М. // Вісник української медичної стоматологічної академії. 2017. Т. 17. № 4(60). С. 5–8.
26. Кузнецов С.Л., Афанасьев М.А. // Биомедицина. 2013. № 1. С. 109–116.
27. Millar L.J., Shi L., Hoerder-Suabedissen A. // Frontiers in cellular neuroscience. 2017. V. 11. P. 1–36.
28. Nalivaeva N.N., Turner A.J., Zhuravin I.A. // Front. Neurosci. 2018. V. 12. P. 1–21.
29. Smith T.F., Schmidt-Kastner R., McGeary J.E., Kaczorowski J.A., Knopik V.S. // Behav. Genet. 2016. V. 46. P. 467–477.
30. Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2019. V. 20(11). P. 665–680.

31. Radons J. // Cell Stress and Chaperones. 2016. V. 21. № 3. P. 379–404.
32. Belenichev I.F., Gorbacheva S.V., Bukhtiyarova N.V., Levich S.V. // Biological Markers and Guided Therapy. 2016. V. 3. P. 107 – 114.
33. Belenichev I.F., Sokolik E.P., Bukhtiyarova N.V., Levich S.V. // Bulletin of Clinical Psychopharmacology. 2016. V. 26(1). P. 11–18.
34. Беленичев И.Ф., Бица Ю.В. // Вісник проблем біології і медицини. 2016. Т. 131(1). № 3. С. 60–65.
35. Belenichev I.F., Voitenko D.S., Bukhtiyarova N.V. // International J. Neurorehabilitation. 2019. V. 6. № 2. P. 312–316.
36. Chekman I.S., Yakovleva I.Yu., Belenichev I.F., Gorchakova N.A., Bukhtiyarova N.V. // Molecular Pharmacology. 2013. V. 2. P. 1–6.
37. Gnezdilova A.V., Ganshina T.S., Mirzoian R.S. // Eksp. Klin. Farmakol. 2010. V. 73(10). P. 11–13.
38. Belenichev I.F., Bukhtiyarova N.V., Mazur I.A. // Neurochemical J. 2013. V. 7. № 4. P. 296–303.
39. Беленичев И.Ф., Павлов С.В. // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. 2010. Т. 6. № 1. С. 12–17.
40. Belenichev I.F., Mazur I.A., Kucherenko L.I., Nagornaya E.A., Gorbacheva S.V., Bidnenko A.S. // Neurochemical J. 2016. V. 10. № 2. P. 131–136.
41. Belenichev I.F., Pavlov S.V., Bukhtiyarova N.V., Samura I.B., Egorov A.N., Semenov D.M. // Biological Markers and Guided Therapy. 2017. V. 4. № 1. P. 105–111.
42. Беленичев И.Ф., Фероз Шах, Чекман И.С., Нагорная Е.А., Горбачева С.В., Горчакова Н.А., Бухтиярова Н.В., Резниченко Ю.Г. // Тиол-дисульфидная система: роль в эндогенной цито- и органопротекции, пути фармакологической модуляции. Киев: ТОВ “Видавництво “Юстон””, 2020. 232 с.
43. Belenichev I., Odnokoz O., Pavlov S., Belenicheva O., Polyakova E. // Neurochemical J. 2012. V. 6. № 3. P. 202–212.
44. Belenichev S.F., Pavlov S.V. // Neurochemical J. 2014. V. 8. № 1. P. 28–32.

Pharmacological Modulation of Endogenous Neuroprotection after Experimental Prenatal Hypoxia

I. F. Belenichev^a, E. G. Aliyeva^a, O. M. Kamyshny^b,
N. V. Bukhtiyarova^a, V. P. Ryzhenko^a, and N. O. Gorchakova^c

^aZaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine

^bTernopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

^cO.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Prenatal hypoxia (PH) causes pathological changes in the brain and can lead to irreversible long-term disorders of its development and the emergence of neuropsychiatric pathologies in children. Pharmacological correction of posthypoxic disorders of the central nervous system is a priority problem in modern medicine. The aim of this study was to study the neuroprotective effect of Angiolin, Thiotriazoline, Tamoxifen, Glutoredoxin, Cerebrocurin, an IL-1b antagonist (RAIL), Mexidol, and L-arginine in comparison with the reference drug Piracetam in terms of their effect on the expression of factors for endogenous neuroprotection for further substantiation of their use in the treatment of prenatal CNS lesions in the model of chronic hemic PH. The expression of mRNA of HSP₇₀, HIF-1, c-fos and the content of HSP₇₀ in the cytoplasmic and mitochondrial fractions of the brain of rat pups on the 60th day of life that underwent PH were studied by real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. It was found that chronic PH leads to inhibition of transcriptional processes in neurons and inhibition of the synthesis of HIF1a, HSP₇₀ and c-fos. The studied drugs are capable of modulating the HSP₇₀-mediated mechanisms of endogenous neuroprotection. The most active among HSP₇₀ modulators under conditions of chronic PG are Cerebrocurin (150 µL/kg) and Angiolin (50 mg/kg), which surpass other studied drugs in terms of increased expression of HSP₇₀ mRNA, HIF-1α mRNA and HSP₇₀ protein concentration in the brain of experimental animals and can be considered as promising neuroprotective agents in complex therapy after PH.

Keywords: prenatal hypoxia, CNS, endogenous neuroprotection, HSP₇₀, c-fos mRNA, HSP₇₀ mRNA, HIF-1α mRNA, HSP₇₀ modulators

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 612.8+577.2

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РЕГУЛЯЦИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ГИППОКАМПЕ И ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ОБУЧЕНИЕ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ СРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА

© 2022 г. Г. В. Карантыш¹, *, А. М. Менджеричский², В. Н. Прокофьев¹,
О. В. Лянгасова¹, М. П. Фоменко¹

¹ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

²ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», Ростов-на-Дону, Россия

Поступила в редакцию 01.01.2021 г.

После доработки 21.07.2021 г.

Принята к публикации 21.08.2021 г.

В данном исследовании представлены результаты сравнительного анализа экспрессии генов регуляции синаптической пластичности, способности к пространственному обучению и сохранению выработанного навыка у животных 3-х и 18-месячного возраста в модели стрептозотоцинового диабета. Оценку пространственного обучения проводили в лабиринте Морриса. В гиппокампе исследовали относительный уровень транскриптов генов *c-fos*, *c-jun*, *Egr-1* и *Cyt-c* с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. На 3-й день тестирования в водном лабиринте Морриса время выхода на платформу у 18-месячных крыс превышало значения 3-месячных животных, как и после моделирования стрептозотоцинового диабета. Уровни экспрессии генов *c-fos*, *c-jun* и *Egr-1* у животных 3-месячного возраста повышались как в ответ на выработку пространственного обучения, так и моделирование диабета, у 18-месячных крыс наблюдали снижение уровня экспрессии данного гена в модели стрептозотоцинового диабета. В обеих группах отмечали повышение уровня экспрессии гена *Cyt-c* в модели диабета относительно контроля, но у 18-месячных животных выявлено более выраженное увеличение данного показателя.

Ключевые слова: крысы 3-х и 18 мес., пространственное обучение, экспрессия генов *c-fos*, *c-jun*, *Egr-1* и *Cyt-c*

DOI: 10.31857/S1027813322010071

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) представляет собой серьезную проблему современного общества. Распространенность сахарного диабета во всем мире резко возросла за последние годы и составляет 422 млн человек [1]. Риск заболеваемости СД увеличивается с возрастом [2]. Развивающийся при этом метаболический синдром приводит к полиограничным нарушениям, формирующимися на фоне ожирения, гипертонии, гипергликемии, дислипидемии и хронического окислительного стресса [3–6 и др.]. СД повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний, деменции, способствует снижению продолжительности жизни и т.д. [7–9 и др.].

Механизмы, лежащие в основе развития деменции у больных сахарным диабетом, исследованы недостаточно, хотя о связи, например, болезни Альцгеймера (БА) с сахарным диабетом сообщают

уже на протяжении нескольких десятилетий. Известно, что сахарный диабет провоцирует развитие микроангиопатий на фоне окислительного стресса и нейровоспалительных процессов [10–12 и др.]. Также при нейродегенеративных процессах нарушается регуляция клеточного цикла, что вместе с окислительным стрессом инициирует патологический каскад реакций в гиппокампе при БА [13–15 и др.].

В условиях СД изменяется экспрессия генов в клетках мозга, что приводит к дисфункции нейронов и глиальных клеток на уровне нарушений передачи сигнала и клеточного цикла, связанных с развитием деменции и болезни Альцгеймера [16]. В процессе старения снижается способность к обучению, хотя молекулярные механизмы, лежащие в основе дефицита памяти, до сих пор не до конца исследованы. Также не до конца определены механизмы, лежащие в основе снижения способности к сохранению ранее выработанных навыков в условиях развития сахарного диабета.

* Адресат для корреспонденции: 344006 Россия, Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42; тел.: +7(863)218-40-00, доб. 11611; e-mail: karantyshgv@mail.ru, gvkarantysh@sfedu.ru.

Таблица 1. Количество животных в экспериментальных группах

Группы животных		3-месячные крысы	18-месячные крысы
Контроль (К)		$n = 8$	$n = 8$
Пространственное обучение (ПО)	3 сутки эксперимента (ПО_3)	$n = 8$	$n = 6$
	24 сутки эксперимента (ПО_24)	$n = 8$	$n = 6$
Стрептозотоциновый диабет (диабет)		$n = 8$	$n = 8$
Пространственное обучение + стрептозотоциновый диабет + (ПО+диабет)	24 сутки эксперимента (ПО+диабет_24)	$n = 8$	$n = 8$

Таблица 2. Дизайн эксперимента

Группа УР (выработка условного рефлекса)	Основная группа
Тестирование в лабиринте Морриса (1–3 дни эксперимента) ($n = 24$)	
+	+
Модель стрептозотоцинового диабета (4–24 дни эксперимента) ($n = 40$)	
–	+
Оценка сохранности выработанного навыка в лабиринте Морриса (24 день эксперимента) ($n = 32$)	
+	+

Примечание: * в таблице не указана контрольная группа животных ($n = 16$), у которых оценивали только уровень экспрессии генов.

Целью данного исследования явилось выявление возрастных изменений способности к пространственному обучению и сохранности выработанного навыка, а также сравнение экспрессии генов регуляции синаптической пластичности (*c-fos*, *c-jun*, *Egr-1* и *Cyt-c*) в гиппокампе у 3-х и 18-месячных крыс в модели стрептозотоцинового диабета.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с директивами Европейского Союза 86/609/ЕЕС по использованию экспериментальных животных и местным законодательством по этике экспериментов на животных. Протоколы для животных были оценены и одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Южного федерального университета (разрешение № 02/2014, 12 февраля 2014 г.).

Эксперимент проведен на беспородных белых крысах-самцах 3-х и 18-месячного возраста. Крыс делили на группы: 1 – контрольная (оценивали только уровень экспрессии генов), 2 – моделирование пространственного обучения в лабиринте Морриса (ПО), 3 – моделирование стрептозотоцинового диабета, 4 – моделирование стрептозотоцинового диабета и пространственного обучения

(диабет + ПО). Количество животных в каждой группе представлено в табл. 1, дизайн эксперимента – в табл. 2.

Экспериментальный диабет вызывали путем однократного введения крысам раствора стрептозотоцина (Sigma) в 0.4 мл цитратного буфера в дозе 50 мг/кг массы тела после 18-часового голодания [17]. На 21 сут после введения стрептозотоцина проводили декапитацию; в крови определяли уровень гликозилированного гемоглобина (HbA1c, %) с использованием анализатора DS5 Glycomat (Великобритания).

Изучение пространственного обучения проводили с использованием лабиринта Морриса [18], представляющего круглый бассейн диаметром 100 см, заполненного непрозрачной белой водой ($t = 24–25^{\circ}\text{C}$) с разведенным сухим молоком. В центре лабиринта располагали платформу из оргстекла площадью 25 см², погруженную на 5 см ниже поверхности воды. Платформа находилась в одном и том же положении в бассейне на всем протяжении эксперимента. Вокруг бассейна помещали два черно-белых рисунка на плотной бумаге (визуальные ориентиры), которые располагали в одинаковом положении вокруг бассейна в течении всего эксперимента. При каждом тестировании животное помещали в лабиринт Морри-

Таблица 3. Последовательности праймеров

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	<i>t</i> плавления, °C
<i>EGR-1</i>	Cac-ctg-acc-aca-gag-tcc-tttt	Aag-tgt-tgc-cac-tgt-tgg-gt	60
<i>c-fos</i>	Ggc-aga-agg-ggc-aaa-gta-ga	Agt-tga-tct-gtc-tcc-gct-tgg	60
<i>c-jun</i>	Ctc-cgg-gct-gtt-cat-ctg-tt	Ccg-gga-ctt-gtg-agc-ttc-tt	60
<i>Cyt c</i>	Ctt-ggg-cta-gag-agc-ggg-a	Tta-aat-tcg-gtc-cgg-gct-gg	60
<i>HPRT1</i>	Tcc-tcc-tca-gac-cgc-ttt-tc	Atc-act-aat-cac-gac-gct-ggg	60

са из разных положений относительно визуальных ориентиров. Тестирование проводили 3 дня подряд: максимальное нахождение в лабиринте Морриса составляло 120 с. После нахождения платформы животное извлекали из бассейна, вручную обсушивали полотенцем и помещали в отдельную клетку с подогревом. На 24 день после первого тестирования у крыс оценивали сохранность пространственной памяти. Учитывали средние показатели времени трех повторов тестирования в водном лабиринте Морриса на 1-й, 2-й, 3-й и 24-й дни эксперимента (между каждым тестом в день эксперимента было не менее 1.0 ч). Критерием обучения служило снижение времени выхода на платформу относительно показателя в 1-й день тестирования в лабиринте Морриса.

Статистическую обработку результатов исследования пространственного обучения проводили с использованием программы Statistica 10.0 (Statsoft, США). Проверку на нормальность распределения экспериментальных данных проводили с использованием критерия Колмагорова-Смирнова. Для оценки межгрупповых различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего ($M \pm SEM$). Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

Относительный уровень транскриптов изучаемых генов исследовали с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) после обратной транскрипции.

Образцы тканей (гиппокампа) крыс забирали через 1 ч после последнего тестирования в лабиринте Морриса, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Количество анализируемых образцов в каждой группе соответствовало количеству животных (табл. 1).

Чтобы избежать деградации, образцы размораживали только один раз. Тотальную РНК из тканей коры и гиппокампа выделяли при помощи набора Aurum Total RNA fatty and fibrous tissue kit (BioRad). Количество и чистоту выделенной РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer (Implen). OD260/280 образцов РНК колебалось от 1.80 до 2.00. Тотальную РНК (0.5 мкг) подвергали обратной транскрипции в кДНК, в объеме смеси 25 мкл. Реакцию обратной

транскрипции проводили с использованием реагентов фирмы Евроген (Россия), в соответствии с инструкцией производителя при 40°C в течение 40 мин, после чего инактивировали при 92°C в течение 10 мин. Дизайн прямых и обратных праймеров для проведения ПЦР-РВ проводили в программе Primer3 с последующей проверкой в IDT. Праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия). Последовательности праймеров приведены в табл. 3. ПЦР-РВ была проведена на амплификаторе CFX-96 фирмы Bio-Rad с использованием готовой реакционной смеси iQ BioRad в объеме 25 мкл, включая по 50 пмоль прямого и обратного праймеров и 1 мкл кДНК. Условия для проведения ПЦР: первичную денатурацию проводили при 95°C 3 мин. Проводили 35 циклов амплификации: 20 с при 95°C , 10 с при 60°C , 20 с при 72°C . Для проверки специфичности после окончания циклов амплификации строили кривую плавления от 65 до 95°C с шагом 0.5°C . В качестве красителя использовали SYBR Green I. Реакцию амплификации для каждого исследуемого гена проводили отдельно в дубликатах. В качестве референсного гена был использован ген *HPRT1*, кодирующий фермент гипоксантин фосфорибозилтрансферазу 1.

Расчет относительной экспрессии проводили, оценивая величины *Ct* (Threshold cycle), получаемые в ходе проведения ПЦР-РВ. Все данные представлены в виде относительных единиц (отн. ед.) уровня мРНК изучаемых генов в сравнении с референсным геном (*HPRT1*), расчет которых проводили по отношению к контрольной группе с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Статистическую обработку результатов исследования экспрессии генов проводили с помощью программы Statistica 10.0 с использованием критериев Колмогорова–Смирнова и Ливиня, а также с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животных, у которых уровень HbA1c после моделирования стрептозотоцинового диабета оставался в пределах контрольных значений, исключали из эксперимента: пять крыс 3-месячного

Таблица 4. Уровень HbA1 (%) в крови у 3-х и 18-месячных крыс в модели стрептозотоцинового диабета, $M \pm SEM$

группы	3-месячные крысы	18-месячные крысы
Контрольная	6.68 ± 0.29 ($n = 8$)	$8.65 \pm 0.38^{*}\#$ ($n = 8$)
Основная	$18.54 \pm 1.37^{*}$ ($n = 15$)	$24.48 \pm 1.79^{*}\#$ ($n = 17$)

* достоверные отличия уровня HbA1 относительно контрольной группы (при $p < 0.05$), # достоверные отличия уровня HbA1 в группах 18-месячных животных относительно показателей в группах 3-месячных крыс (при $p < 0.05$)

Таблица 5. Время выхода на платформу (с) у 3-х и 18-месячных крыс в модели стрептозотоцинового диабета, $M \pm SEM$

Дни эксперимента/возраст крыс		3-месячные	18-месячные
Пространственное обучение	1	18.48 ± 1.02	25.87 ± 1.43#
	2	11.63 ± 0.64*	17.52 ± 0.94*#
	3	6.35 ± 0.37*	8.43 ± 0.48*#
	24	8.76 ± 0.45*	13.69 ± 0.84*#
Пространственное обучение + диабет	1	17.59 ± 0.93	23.85 ± 1.16#
	2	12.06 ± 0.71*	15.39 ± 0.82*#
	3	6.71 ± 0.39*	8.10 ± 0.41*
	24	12.85 ± 0.69*§	26.98 ± 0.96#

* достоверные отличия времени выхода на платформу относительно 1 дня эксперимента; § достоверные отличия показателей в группе крыс в модели пространственного обучения и стрептозотоцинового диабета относительно значений в группе животных, которым моделировали только пространственное обучение (при $p < 0.05$), # достоверные отличия показателей в группах 18-месячных животных относительно значений в группах 3-месячных крыс (при $p < 0.05$)

возраста и три крысы 18-месячного возраста. Анализ результатов исследования уровня HbA1 показал, что данный показатель после моделирования диабета был значительно выше исходных значений как у 3-месячных, так и, особенно, 18-месячных крыс ($p < 0.001$) (табл. 4).

В динамике трех дней тестирования в лабиринте Морриса было установлено снижение времени платформы как у 3-месячных, так и 18-месячных животных. Достоверных различий показателей времени выхода на платформу в каждый день тестирования на этапе обучения в группе 3-месячных животных не установлено, как и в группе 18-месячных крыс (табл. 5).

В контрольной группе на 3-й день тестирования в лабиринте Морриса среднее значение времени выхода на платформу у 18-месячных крыс было на 32% ($p < 0.05$) выше относительно 3-месячных животных, а в модели ПО + диабет_3 — на 21% ($0.05 < p < 0.1$). Сходная динамика показателей времени выхода на платформу в ходе пространственного обучения в обеих группах (контроль и ПО + диабет_3) объясняется тем, что моделирование диабета во втором случае осуществляли после 3-х дней тестирования в лабиринте Морриса.

В результате проведения оценки сохранности пространственного обучения в лабиринте Морриса установлено, что на 24-й день эксперимента у животных 3-месячного возраста контрольной группы и в модели ПО + диабет_24 время выхода на платформу увеличивалось на 38% ($p < 0.05$) и 92% ($p < 0.05$), соответственно. У 18-месячных крыс наблюдали еще более значительное возрастание времени выхода на платформу относительно значений на 3 день эксперимента: в контрольной группе увеличение данного показателя составило 74% ($p < 0.01$), а в модели ПО + диабет_24 — на 233%

($p < 0.0001$) (табл. 5). Это подтверждает существующее представление о том, что с возрастом снижается способность к обучению, в частности к пространственному обучению [19].

Анализ экспрессии генов регуляции синаптической пластичности показал, что на 3-й день эксперимента у 3-месячных крыс происходило возрастание уровня экспрессии гена *c-fos* (рис. 1). Ген *c-fos* связан с различными сигнальными каскадами, участвующими в процессах пластичности нейронов, роста клеток и митозе. При этом уровень экспрессии данного гена был выше контрольных значений у 3-месячных крыс и на 24-й день эксперимента, а также в модели ПО + диабет_24. У 18-месячных крыс наблюдали сниженные значения относительной экспрессии гена *c-fos* по сравнению с 3-месячными животными; после моделирования стрептозотоцинового диабета и, в меньшей степени, в модели ПО + диабет_24 у 18-месячных животных установлено достоверное уменьшение уровня экспрессии данного гена относительно контрольных показателей у животных этого возраста. Повышение экспрессии гена *c-fos* в гиппокампе после тестирования в водном лабиринте Морриса, а также в модели ПО + диабет_24 у 3-месячных животных в отличие от 18-месячных крыс может отражать возрастные различия уровня экспрессии данного гена в ответ на предъявление стрессовых воздействий разной интенсивности. Следует отметить, что у 3-месячных в модели ПО + диабет_24 время выхода на платформу было ниже значения в первый день обучения, что наблюдали на фоне роста уровня экспрессии гена *c-fos*. В тоже время у 18-месячных животных время выхода на платформу в модели ПО + диабет_24 не отличалось от показателя на 1-й день тестирования в лабиринте Морриса, и

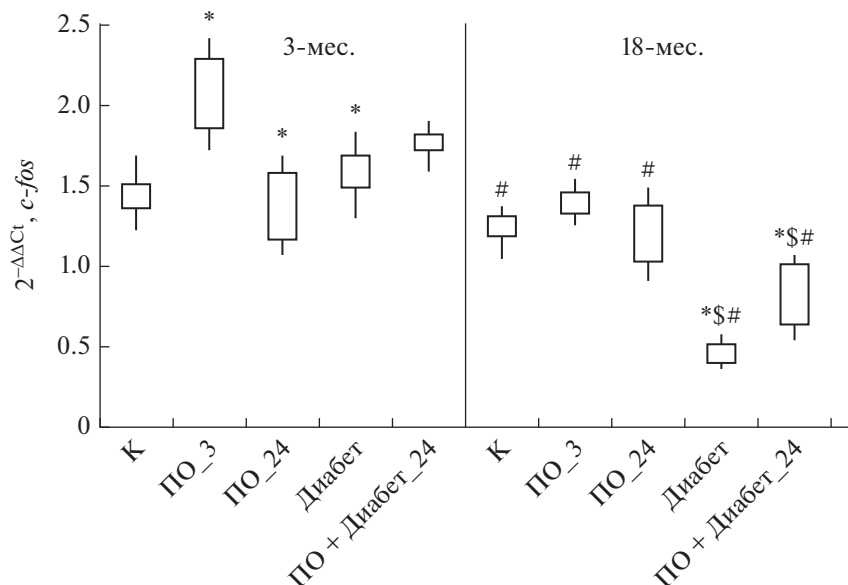


Рис. 1. Относительная экспрессия гена *c-fos* в гиппокампе у 3-х ($n = 40$) и 18-месячных крыс ($n = 36$) в модели стрептозотоцинового диабета. Примечание: К — контрольная группа; ПО — группа животных в модели пространственного обучения (ПО_3 — 3-й день эксперимента, ПО_24 — 24-й день эксперимента); диабет — модель стрептозотоцинового диабета (24 день эксперимента); ПО + диабет_24 — группа крыс в модели стрептозотоцинового диабета после пространственного обучения (24 день эксперимента). * достоверные отличия показателей относительно контрольных значений; § достоверные отличия показателей относительно значений в группе УР_3; # достоверные отличия у 18-месячных животных показателей относительно значений у 3-месячных крыс (при $p < 0.05$).

у этих животных уровень экспрессии гена *c-fos* был ниже контрольных показателей (табл. 5, рис. 1).

Известно, что ген *c-fos* кодирует ядерный фосфопротеин Fos, который образует димерный комплекс с белком Jun, имеющим участки связывания последовательности ДНК для белка-активатора фактора транскрипции-1 (AP-1) [20]. При изучении уровня экспрессии гена *c-jun* установлено, что у 3-месячных животных данный показатель значительно повышается в моделях стрептозотоцинового диабета и ПО + диабет_24, тогда как у 18-месячных крыс, напротив, в данных моделях, особенно, в модели стрептозотоцинового диабета, уровень его экспрессии снижается относительно контрольных значений. Также показано, что у этих крыс уровень экспрессии гена *c-jun* снижен на 3-й день эксперимента по сравнению с 3-месячными животными (рис. 2).

Анализ результатов исследования экспрессии гена *Egr-1*, связанного с синаптической активностью зрелых нейронов, индуктором транскрипции которого является активация НМДА-рецепторов [21], показал следующее. У 3-х и 18-месячных крыс изменение уровня экспрессии данного гена выявлено только в модели ПО + диабет_24: у 3-месячных животных наблюдали повышение экспрессии *Egr-1*, а у животных 18-месячного возраста, напротив, ее снижение по сравнению с контрольными значениями. Также установлено, что после тестирования в лабиринте Морриса и в модели ПО + диабет_24 у 18-месячных крыс уро-

вень экспрессии был ниже относительно 3-месячных животных в этих же экспериментальных моделях (рис. 3).

При изучении уровня экспрессии гена *Cyt-c*, кодирующего белок цитохром *c*, наблюдали повышение его экспрессии в гиппокампе у 3-х и, особенно, 18-месячных животных в модели ПО + диабет_24 и, особенно, в модели стрептозотоцинового диабета. Также установлено, что у 18-месячных крыс уровень экспрессии данного гена превышал значения у 3-месячных животных как в контрольной группе, так и в модели ПО + диабет_24 (рис. 4). Повышение экспрессии гена *Cyt-c*, как известно, усиливает активность каспаз-3 и -9, что сопровождается активацией апоптоза клеток мозга, а также выходом цитохрома-*c* из мембран и развитием окислительного стресса [22].

Таким образом, у 18-месячных крыс снижение обучаемости в лабиринте Морриса, а также нарушение сохранности ранее выработанного пространственного обучения, особенно, при моделировании стрептозотоцинового диабета, сопровождается изменением экспрессии генов регуляции синаптической пластичности относительно 3-месячных животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Механизмы, происходящие в мозге при развитии сахарного диабета, остаются недостаточно

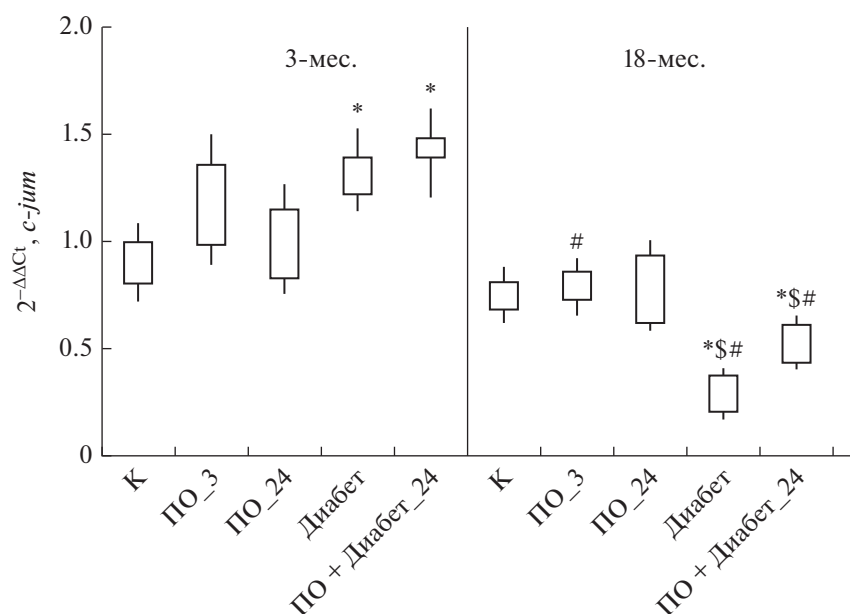


Рис. 2. Относительная экспрессия гена *c-jun* в гиппокампе у 3-х ($n = 40$) и 18-месячных крыс ($n = 36$) в модели стрептозототинового диабета. Примечание: см. рис. 1.

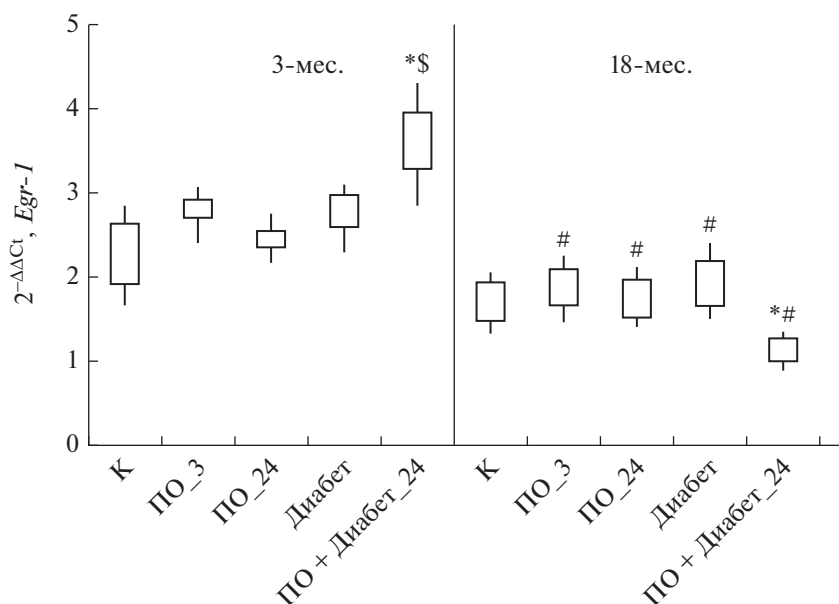


Рис. 3. Относительная экспрессия гена *Egr-1* в гиппокампе у 3-х ($n = 40$) и 18-месячных крыс ($n = 36$) в модели стрептозототинового диабета. Примечание: см. рис. 1.

исследованными. В настоящее время известны следующие факторы, влияющие на функции инсулина в мозге. Инсулин способен проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [23, 24] с помощью переносчика. Данный процесс является регулируемым, зависит от уровня периферического инсулина: если его уровень повышается, это приводит к росту уровня инсулина в спинномозговой жидкости, но в условиях периферической гиперинсулинемии наблюдается подавление связывания рецепторов инсулина в клетках ГЭБ с инсу-

лином, что препятствует транспорту инсулина в мозг [25, 26]. Периферический инсулин может проникать в ЦНС и непосредственно через area postrema и околожелудочковую область, что обеспечивает свободную диффузию растворимых в плазме веществ непосредственно в эту область [27].

В мозге выявлено множество сигнальных путей инсулина, которые принимают участие в регуляции метаболизма мозга, дифференцировки и роста нейронов, а также нейромодуляции [28].

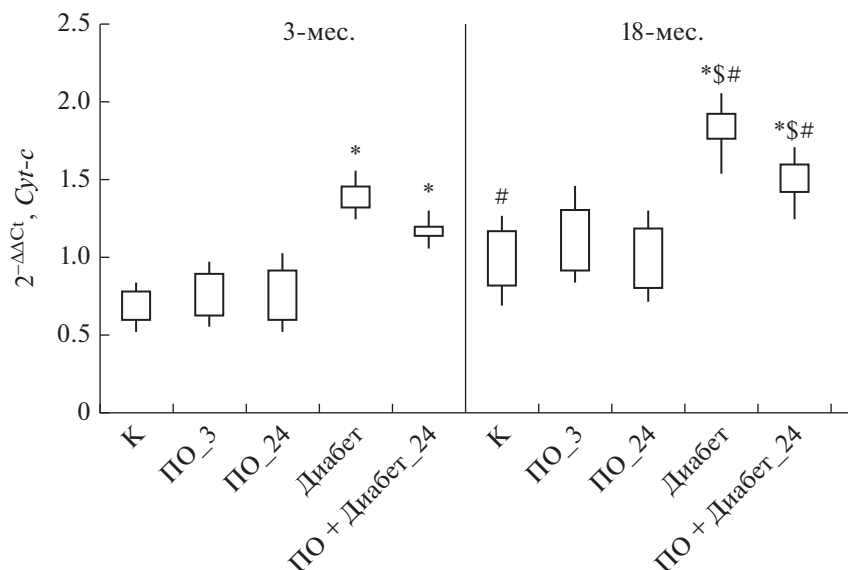


Рис. 4. Относительная экспрессия гена *Cyt-c* в гиппокампе у 3-х ($n = 40$) и 18-месячных крыс ($n = 36$) в модели стрептозототинового диабета. Примечание: см. рис. 1.

При недостаточности инсулина в мозге может приводить к нейрональной гибели путем апоптоза [29]. Таким образом, эти данные, а также тот факт, что недостаточность инсулина может быть связана с развитием болезни Альцгеймера, доказывают участие инсулина в пластических процессах, связанных с поведением.

В настоящее время насчитывают семь различных путей инициации болезни Альцгеймера в результате развития сахарного диабета. Один из них — это повышение активности инсулин-деградирующего фермента в областях мозга, чувствительных к инсулину, в том числе, в гиппокампе [30]. Данный фермент также способен снижать экспрессию белков, участвующих в синаптической пластичности [31]. В то же время повышение уровня инсулиноподобного фактора роста может приводить к развитию окислительного стресса [32] в тканях мозга и как результат, стать одним из факторов накопления бета-амилоида [24].

В последние десятилетия открытие инсулиновых рецепторов в областях мозга, связанных с обучением и памятью, привело к формированию понимания роли инсулина в процессе старения мозга и развитии нейродегенеративных заболеваний, и, таким образом, о его влиянии на пластические процессы [33, 34].

Модификация активности синапсов и изменение их количества является функциональным и структурным субстратом для пластических процессов, лежащих в основе обучения и памяти, а также закрепления поведенческих изменений [35]. Стимуляция инсулином нейронов гиппокампа вызывает как пресинаптические, так и постсинаптические эффекты. Инсулин повышает высвобождение нейротрансмиттеров из пресинаптических

терминалей [36], поэтому в условиях недостатка инсулина в мозге, как например, при сахарном диабете, возможно снижение способности к обучению.

В моделях диабета, чаще всего индуцированных стрептозототином, у животных, выявляется незначительное снижение объема памяти [37, 38]. Это подтверждается полученными в данном исследовании результатами. Наиболее выражено снижение способности сохранять ранее выработанный навык установлен у 18-месячных крыс. Это сопровождается изменением уровня экспрессии генов регуляторов синаптической пластичности.

Снижение уровней экспрессии ранних генов *c-fos* и *c-jun*, связанных с сигнальными каскадами, участвующими в процессах пластичности нейронов, роста клеток и митозе, установлено у 18-месячных крыс, особенно, в модели ПО + диабет_24. Семейство белков Jun и родственные им Fos-белки образуют многочисленное количество комбинаций, контролирующих поздние гены и белки, связанные с процессами памяти, моторики и обучения [39]. Гены *c-fos* и *c-jun* являются важными компонентами взаимодействий между генами и стимулами из окружающей среды, поскольку они обеспечивают молекулярную основу для быстрого и динамического ответа нейронов и открывают возможность для длительной и устойчивой адаптации посредством регуляции экспрессии широкого спектра поздних генов. Таким образом, ранние гены тесно связаны с изменением активности нейронов, а также с различными процессами, регулируемые центральной нервной системой, такими как обучение, память и т.д. [40]. Тем не менее, регуляция экспрессии этих

двух генов может различаться при действии разных факторов [41]. В данном исследовании у крыс, которых тестировали в лабиринте Морриса, изменения уровня экспрессии генов *c-fos* и *c-jun* у 3-месячных крыс не были сопоставлены: возрастание уровня экспрессии гена *c-fos* происходило на фоне отсутствия изменений экспрессии гена *c-jun*. В тоже время у 18-месячных животных в модели ПО + диабет₂₄ снижалась экспрессия обоих генов.

Разнонаправленное изменение экспрессии гена *Egr-1* у 3-х и 18-месячных животных может отражать возрастные изменения его регуляции в условиях одинаковых внешних воздействий на организм. Согласно существующим представлениям экспрессия гена *Egr-1* может активироваться при большом разнообразии стимулов, что отражается в его повышающей регуляции после увеличения уровня внутриклеточного кальция в нейронах гиппокампа. Это дало основание предполагать, что возрастание уровня экспрессии этого гена в структурах мозга в выше перечисленных экспериментальных моделях может лежать в основе повышения нейрональной активности, нейроадаптационных реакций, лежащих в основе обучения и памяти, а также реакции на стресс [42, 43]. Кроме того, известно, что электрическая стимуляция нейронов, приводящая к развитию длительной потенциации, способствует возрастанию уровня мРНК *Egr-1*, индуктором экспрессии которой является активация НМДА-рецепторов [21]. Поэтому предполагают, что у экспериментальных животных, у которых в структурах мозга наблюдается возрастание экспрессии данного гена происходит активация НМДА-рецепторов [44].

Повышение уровня экспрессии гена *Cyt-c* в гиппокампе у 18-месячных крыс, особенно, в модели ПО + диабет₂₄ предположительно может сопровождаться и ростом уровня цитозольного цитохрома с, который играет ключевую роль в активации апоптоза нейронов [45] через запуск каскада каспаз. При этом показано, что инсулин способен подавлять высвобождение цитохрома с из митохондрий посредством P13-K-зависимого пути и оказывать нейропротекторные эффекты в условиях окислительного стресса [46].

Таким образом, в основе возрастных изменений обучения и памяти лежат молекулярные механизмы, регуляция которых, вероятно, изменяется на фоне развивающегося окислительного стресса в структурах мозга и сопутствующих патологий, в частности, развития сахарного диабета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность к пространственному обучению и сохранности выработанного навыка в лабиринте Морриса выше у 3-месячных крыс относительно 18-месячных животных. В модели стрептозотоцинового диабета после обучения в лабиринте Морриса снижение сохранности выработанного навыка у 18-месячных крыс наблюдается на фоне

значительного повышения экспрессии гена *Cyt-c* и понижении экспрессии генов *c-fos*, *c-jun* и *Egr-1*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № 0852-2020-0028.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все применимые международные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global report on diabetes. World Health Organization 2016. (Globally, an estimated 422 million adults were living with diabetes in 2014, compared to 108 million in 1980. The global prevalence (age-standardized) of diabetes has nearly doubled since 1980, rising from 4.7% to 8.5% in the adult population.)
2. Dal Canto E., Ceriello A., Rydén L., Ferrini M., Hansen T.B., Schnell O., Standl E., Beulens J.W. // Eur. J. Prev. Cardiol. 2019. V. 26. Suppl 2. P. 25–32.
3. Feldman E.L., Callaghan B.C., Pop-Busui R., Zochodne D.W., Wright D.E., Bennett D.L., Bril V., Russell J.W., Viswanathan V. // Nat Rev Dis Primers. 2019. V. 5. № 1. e41.
4. Hedayati N., Bemani N.M., Mohammadinejad A., Mohajeri S.A. // Phytother. Res. 2019. V. 33. № 12. P. 3040–3053.
5. Huang X., Liu G., Guo J., Su Z. // Int. J. Biol. Sci. 2018. V. 14. № 11. P. 1483–1496.
6. Verhulst M.J.L., Loos B.G., Gerdes V.E.A., Teeuw W.J. // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2019. V. 10. e56.
7. Bharadwaj P., Wijesekara N., Liyanapathirana M., Newsholme P., Ittner L., Fraser P., Verdile G. // J. Alzheimers Dis. 2017. V. 59. P. 421–432.
8. Sutherland G.T., Lim J., Srikanth V., Bruce D. // J. Alzheimers Dis. 2017. V. 59. P. 393–403.
9. Batkulwar K., Godbole R., Banarjee R., Kassasr O., Williams R., Kulkarni M. // ACS Chem. Neurosci. 2018. V. 9. P. 988–1000.
10. Pugazhenth S., Qin L., Reddy P.H. // Biochim Biophys Acta Mol. Basis Dis. 2017. V. 1863. № 5. P. 1037–1045.
11. Umeno A., Biju V., Yoshida Y. // Free Radic. Res. 2017. V. 51(4). P. 413–427.
12. Sun Y., Ma C., Sun H., Wang H., Peng W., Zhou Z., Wang H., Pi C., Shi Y., He X. // J. Diabetes Res. 2020. V. 2020. e4981814.
13. Webber K.M., Raina A.K., Marlatt M.W., Zhu X., Prat M.I., Morelli L., Casadesus G., Perry G., Smith M.A. // Mech. Ageing Dev. 2005. V. 126. № 10. P. 1019–1025.
14. Koseoglu M.M., Norambuena A., Sharlow E.R., Lazo J.S., Bloom G.S. // J. Alzheimers Dis. 2019. V. 67. 1. P. 1–11.
15. Ippati S., Deng Y., van der Hoven J., Heu C., van Hummel A., Chua S.W., Paric E., Chan G., Feiten A., Fath T., Ke Y.D., Haass N.K., Ittner L.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118. № 12. e2011876118.

16. Bury J.J., Chambers A., Heath P.R., Ince P.G., Shaw P.J., Matthews F.E., Brayne C., Simpson J.E., Wharton S.B. // Cognitive Function and Ageing Study. Acta Neuropathol. Commun. 2021. V. 9. № 1. e5.
17. Szkudelski T. // Ibid. 2001. V. 50. № 6. P. 536–546.
18. Morris R.G. // J. Neurosci. Meth. 1984. V. 11. P. 47–60.
19. Coppola V.J., Bingman V.P. // Neurobiol. Aging. 2020. V. 87. P. 98–107.
20. Barros V.N., Mundim M., Galindo L.T., Bittencourt S., Porcionatto M., Mello L.E. // Front. Cell. Neurosci. 2015. V. 9. e72.
21. Qin X., Jiang Y., Tse Y.C., Wang Y., Wong T.P., Paudel H.K. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 49. P. e29603–e29616.
22. Jiang W., Chen Y., Li B., Gao S. // Mol. Biosyst. 2017. V. 13(9). P. 1863–1873.
23. Larion Z. // Archives of Physiology and Biochemistry. 2009. V. 115. № 2. P. 112–116.
24. Mittal Kh., Mani R.J., Katare D.P. // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 6. e25589.
25. Moreira P. I., Duarte A. I., Santos M. S., Rego A. C., Oliveira C. R. // J. Alzheimer's Disease. 2009. V. 16. № 4. P. 741–761.
26. Duarte A.I., Moreira P.I., Oliveira C.R. // J. Aging Research. 2012. V. 2021. e384017.
27. Sankar R., Thamotharan S., Shin D., Moley K.H., Devaskar S.U. // Molecular Brain Research. 2002. V. 107. № 2. P. 157–165.
28. Gasparini L., Xu H. // Trends in Neurosciences. 2003. V. 26(8). P. 404–406.
29. Huang T.J., Verkhratsky A., Fernyhough P. // Molecular and Cellular Neuroscience. 2005. V. 28. № 1. P. 42–54.
30. Ren H. // Mol. Metab. 2014. V. 3. P. 452–459.
31. Ding L., Becker A.B., Suzuki A., Roth R.A. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 2414–2420.
32. Lin T., Wang D., Nagpal M. L., Chang W., Calkins J.H. // Endocrinology. 1992. V. 130. P. 1217–1224.
33. Mainardi M., Fusco S., Grassi C. // Neural Plast. 2015. V. 2015. e657928.
34. Kullmann S., Heni M., Hallschmid M., Fritsche A., Preissl H., Haring H.U. // Physiol. Rev. 2016. V. 96. P. 1169–1209.
35. Nakahata Y., Yasuda R. // Front. Synaptic Neurosci. 2018. V. 10. e29.
36. Lee C.C., Huang C.C., Hsu K.S. // Neuropharmacology. 2011. V. 61. P. 867–879.
37. Biessels G.J., Kamal A., Urban I.J., Spruijt B.M., Erkelens D.W., Gispen W.H. // Brain Res. 1998. V. 800. P. 125–135.
38. Popovic M., Biessels G.J., Isaacson R.L., Gispen W.H. // Behav. Brain Res. 2001. V. 122. P. 201–207.
39. Varela P., Escosteguy-Neto J.C., Coelho C.T., Mello L.E., da Silveira D.X., Santos-Junior J.G. // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2014. V. 17. № 11. P. 1815–1830.
40. Bahrami S., Drablos F. // Adv. Biol. Regul. 2016. V. 62. P. 37–49.
41. Knox D., Stanfield B.R., Staib J.M., David N.P., DePietro T., Chamness M., Schneider E.K., Keller S.M., Lawless C. // Behav. Brain Res. 2018. V. 341. P. 189–197.
42. Hendrickx A., Pierrot N., Tasiaux B., Schakman O., Kienlen-Campard P., De Smet C., Octave J.-N. // PLoS One. 2014. V. 9. e99467.
43. Rusconi F., Grillo B., Ponzoni L., Bassani S., Toffolo E., Paganini L., Mallei A., Braida D., Passafaro M., Popoli M., Sala M., Battaglioli E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 3651–3656.
44. Duclot F., Kabbaj M. // Genome Biology. 2015. V. 16. e256.
45. Cao G., Xing J., Xiao X., Liou A.K., Gao Y., Yin X.M., Clark R.S., Graham S.H., Chen J. // J. Neurosci. 2007. V. 27. P. 9278–9293.
46. Guerra-Castellano A., Díaz-Quintana A., Pérez-Mejías G., Elena-Real C.A., González-Arzola K., García-Mauriño S.M., De la Rosa M.A., Díaz-Moreno I. // PNAS. 2018. V. 115(31). P. 7955–7960.

Expression of Genes for Regulating Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spatial Learning in Rats of Different Age under Conditions of Modeling Streptozotocin Diabetes

G. V. Karantysh^a, A. M. Mendzheritsky^b, V. N. Prokofiev^a, O. V. Lyangasova^a, and M. P. Fomenko^a

^a FSAEI HE “Southern Federal University”, Rostov-on-Don, Russia

^b FSAEI HE “Don Southern Technical University”, Rostov-on-Don, Russia

This study presents the results of a comparative analysis of the expression of genes for the regulating synaptic plasticity, the ability to spatial learning, and the preservation of the acquired skill in 3-months old and 18-months old animals, in a model of streptozotocin diabetes. The Morris maze was used to assess the spatial learning. In the hippocampus, the relative level of transcripts of the *c-fos*, *c-jun*, *Egr-1*, and *Cyt-c* genes was investigated using the real-time polymerase chain reaction method. On the 3rd day of testing in the Morris water maze, the time to reach the platform in 18-months old rats exceeded the respective values of 3-months old rats, as after modeling streptozotocin diabetes. The expression levels of the *c-fos*, *c-jun*, and *Egr-1* genes in 3-months rats increased both in response to the development of spatial learning and modeling of diabetes; in 18-months old rats, a decrease in the level of expression of this gene was observed in the model of streptozotocin diabetes. In both groups, an increase in the level of expression of the *Cyt-c* gene in the model of diabetes relative to control was noted, but in 18-months old rats, a more pronounced increase in this indicator was revealed.

Keywords: 3-months old and 18-months old rats, spatial learning, expression of genes *c-fos*, *c-jun*, *Egr-1* and *Cyt-c*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 615.017

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОСТРОВКОВОЙ КОРЕ И ПЕРЕДНЕЙ ПОЯСНОЙ КОРЕ У ИНТАКТНЫХ САМЦОВ И САМОК ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ХРОНИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭТАНОЛА

© 2022 г. В. Г. Коньков¹ *, В. С. Кудрин¹, В. Б. Наркевич¹,
А. О. Ефимова¹, Т. Д. Никифорова¹, Л. Г. Колик¹

¹ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.05.2021 г.

После доработки 07.07.2021 г.

Принята к публикации 14.07.2021 г.

Проблемы с психическим здоровьем, обусловленные действием алкоголя, включая повышенный риск развития тревожно-депрессивных расстройств и алкогольной зависимости, нередко передаются из поколения в поколение. В настоящее время отсутствуют работы, рассматривающие влияние длительного действия алкоголя на содержание нейромедиаторных моноаминов и нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга, отвечающих за формирование эмоциональных и мотивационных паттернов поведения, у первого F1 поколения при отсутствии прямого воздействия алкоголя на плод. Целью работы являлось изучение тревожного поведения и нейрохимических изменений в островковой коре и передней поясной коре (ППК) у интактного потомства крыс, потреблявших раствор этанола в течение 30-ти недель до спаривания. В тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” самки проводили больше времени в открытых рукавах по сравнению с самцами, однако значимых отличий в реакции на стресс между потомством подвергнутых и не подвергнутых воздействию этанола крыс не выявлено. В опытах *ex vivo* в островковой коре отмечалось снижение оборота внеклеточного дофамина у животных обоих полов ($p < 0.05$) и разнонаправленные сдвиги в суммарном обороте дофамина при отсутствии изменений в содержания нейромедиаторных аминокислот. В ППК наблюдалось уменьшение содержания глицина ($p < 0.05$) только у самок. Полученные данные свидетельствуют о влиянии этанола при длительном введении *reg os* на зависимые от пола изменения в содержании нейротрансмиттерных моноаминов и аминокислот в структурах мозга, определяющих формирование эмоционального и мотивационного поведения у ранее не подвергнутого действию этанола потомства.

Ключевые слова: этанол, крысы, тревожность, островковая кора, передняя поясная кора, нейромедиаторные моноамины и аминокислоты, ВЭЖХ

DOI: 10.31857/S1027813322010083

ВВЕДЕНИЕ

Проблемы с психическим здоровьем, обусловленные действием алкоголя, включая повышенный риск развития тревожно-депрессивных расстройств и алкогольной зависимости, нередко передаются из поколения в поколение [1–3]. В опытах *in vivo* доказано, что эпигенетические факторы могут быть ответственны за наследование спровоцированных алкоголем нарушений. Так, субхроническое внутрижелудочное введение алкоголя в “подростковом” возрасте приводило к изменению метилирования ДНК в гипоталамусе у ранее не подвергнутого действию этанола потомства крыс первого поколения [4]. Кроме того, у крысят на-

блюдалось снижение массы тела и маркеров пубертатного развития, что может также свидетельствовать о неблагоприятном влиянии введения этанола на эпигенетические признаки в первом поколении [5]. Подобные наблюдения имеют большое значение для терапии алкоголизма, поскольку алкоголь является наиболее распространенным легальным психоактивным веществом, и его неограниченное потребление является серьезной проблемой с долгосрочными негативными последствиями [6, 7].

Ряд областей мозга, к числу которых относятся миндалевидное тело, гиппокамп, паравентрикулярное ядро гипоталамуса, тесно связаны с формированием эмоционально-стрессовой реакции как у человека, так и у грызунов [8]. Островковая кора (*insula*), также относится к числу областей

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, Балтийская ул., 8, e-mail: asbest321@gmail.com.

мозга, связанных с развитием тревожных реакций [9] и управляющих регуляцией мотивационного поведения, в том числе в отношении психоактивных веществ [10]. Работа S. Betka et al. (2019) стала первым исследованием, охарактеризовавшим нейрохимический и морфологический профиль островковой коры у потребляющих алкоголь молодых людей и показавшим связь между алкоголем и нейрохимической/структурной целостностью островковой коры [11], что позволяет предположить значимость этих нейробиологических характеристик при утрате контроля над потреблением на фоне длительного “увлечения” алкоголем.

Передняя поясная кора (ППК) посредством тесных нейроанатомических связей с передней островковой корой, миндалевидным телом, префронтальной корой и стриатумом вовлечена в регуляцию обработки информации, имеющей эмоциональную окраску. Результаты исследований, полученные с помощью магнитно-резонансной томографии, подтверждают ключевую роль ППК в интеграции interoцептивных, эмоциональных и когнитивных функций через взаимодействие с островком и стриатумом во время оценки выраженности эмоций у здоровых добровольцев и ослабление этой интеграции на фоне различных тревожных расстройств [12]. Кроме того, получены данные об активации ППК визуальными раздражителями, связанными с психоактивными веществами [13].

Несмотря на большое количество поведенческих и молекулярно-биологических экспериментальных исследований последствий пренатального воздействия алкоголя на потомство, количество публикаций, посвященных влиянию потребления алкоголя до спаривания крыс на потомство, ограничено и преимущественно описывает влияние непродолжительного воздействия алкоголя в режиме “запойного” потребления (“binge-drinking”) в подростковом возрасте [4, 14, 15]. В настоящее время отсутствуют работы, рассматривающие влияние длительного действия алкоголя на содержание нейротрансмиттерных моноаминов и аминокислот в структурах мозга, отвечающих за формирование эмоциональных и мотивационных паттернов поведения у первого F1 поколения, не подвергавшегося непосредственному воздействию алкоголя на плод.

Целью работы являлось изучение тревожного поведения и нейрохимических изменений, развивающихся в островковой коре и ППК у интактного потомства от крыс, потреблявших раствор этанола в течение 30-ти недель до спаривания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных крысах (К) самцах ($n = 19$) и самках ($n = 17$) весом 210–240 г, (питомник “Столбовая” ФГБНУ “Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России”, Московская обл.). Также в работе использовали потомство (А) крыс (самки и самцы) того же возраста, полученное при спаривании самцов ($n = 9$), потреблявших 10% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости в режиме ежедневно (моделирование “хронического потребления алкоголя”), с самками ($n = 14$), которым 10% этанол предоставляли в качестве единственного источника жидкости в течение 3-х дней в неделю (“week-end drinking”). Среднесуточное потребление этанола рассчитывалось на 30-й неделе потребления по данным потребления за 3 дня (понедельник–среда–пятница) у “родителей” составляло 4.4 ± 0.7 г/кг (самцы) и 5.9 ± 0.3 г/кг (самки). За 48 ч до спаривания у всех животных (самцы и самки) лишали доступа к этанолу и предоставляли только воду в качестве источника жидкости, то есть во время спаривания крысы не испытывали действия этанола, также как и самки в течение всего периода беременности, таким образом потомство никогда не подвергалось непосредственному воздействию алкоголя.

За начальную точку постнатального периода мы принимали постнатальный день 0 (ПНД0). Животных из контрольной (К) группы, “родители” которых не имели доступа к алкоголю, и из опытной (А) группы, то есть потомство F1 от крыс, подверженных экспозиции с раствором этанола, начиная с возраста ПНД 26 до ПНД 62–65, содержали в клетках по 5 особей со свободным доступом к воде и гранулированному корму при регулируемом 12/12 (свет/темнота) световом режиме в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств”. Поведенческие исследования выполнены на молодых половозрелых крысах в возрасте 2-х месяцев, что соответствует возрасту человека в период полового созревания, когда биологические и социальные факторы оказывают наибольшее влияние на формирование алкогольной мотивации у подростков и молодых людей. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с “Правилами работы с животными”, утвержденными биоэтической комиссией ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”.

Схема эксперимента. Животные были разделены на следующие экспериментальные группы:

1. К♂ (самцы, $n = 9$)
2. К♀ (самки, $n = 8$)
3. А♂ (самцы, потомство крыс, получавших раствор этанола, $n = 10$)
4. А♀ (самки, потомство крыс, получавших раствор этанола, $n = 9$)

Поведенческие исследования проводили в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), позволяющем оценить выраженность эмоциональной реакции и уровень тревожности, двигательную активность, а также скорость ориентировочных реакций у грызунов.

Установка ПКЛ, приподнятая на высоту 50 см, состоит из 2-х открытых рукавов, расположенных напротив друг друга (50×10 см) и двух закрытых рукавов ($50 \times 10 \times 40$ см) (НПК Открытая Наука, Россия). Животное помещали в центр лабиринта мордой по направлению к открытому рукаву. В течение 300 с визуально регистрировали время пребывания в открытых рукавах и на центральной площадке, число выходов в открытые и закрытые рукава и количество свешиваний головы (направленная исследовательская активность) [16].

Нейрохимические исследования. По завершении поведенческих исследований животных декапитировали, после чего извлекали на льду ППК и островковую кору, замораживали в жидком азоте и взвешивали. Забор биоматериала у самок крыс осуществляли в фазу диэструса. Пробы хранили в жидком азоте. Перед экспериментами по определению содержания нейротрансмиттеров пробы размельчали в гомогенизаторе поттера (тефлон-стекло) в 1 мл 0.1 н HClO_4 с добавлением 3,4-диоксибензиламина (0.5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Содержание моноаминов и их метаболитов (3-метокси-4-оксифенилгликоля (МОФЕГ), норадреналина (НА), дофамина (ДА), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), 3-метокситирамина (3-МТ), серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, США) с аналитической колонкой ReproSil-Pur ODS (C18, 100×4 мм, 3 мкм) (Dr. Maisch, Германия), при скорости элюции подвижной фазы 1,0 мл/мин и давлении до 200 атм. Мобильная фаза состояла из: 0.1 М цитратно-фосфатного буфера, содержащего 1.1 мМ октансульфоновой кислоты, 0.1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3.0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4B (BAS США) на двойном стеклоугольном электроде (+0.85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. МОФЕГ, НА, ДА, ДОФУК, ГВК, 3-МТ, 5-ОТ, 5-ОИУК в начальной концентрации 0.5 нмоль/мл в

0.1 н HClO_4 использовали в качестве стандартной смеси для калибровки. Регистрация образцов проводилась с применением аппаратно-программного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1.5 (АМПЕРСЕНД) [17]. Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о. с. ч. или analytical grade.

Определение содержания тормозных (ГАМК, глицин, таурин) и возбуждающих (аспартат, глутамат) нейромедиаторных аминокислот проводили методом ВЭЖХ/ФД согласно модифицированной методике [18]. Перед анализом ткань гомогенизировали в 1 мл 0.1 н HClO_4 замороженные в жидком азоте и взвешенные биологические пробы в 5 мл гомогенизаторе тефлон-стекло. Затем образцы центрифугировали при 10000 об./мин в течение 15 мин. К 0.025 мл супернатанта добавляли 0.05 мл 0.1 н NaOH, и 0.025 мл ортофталевого реагента для запуска реакцию дериватизации. Через 20 мин 20 мкл полученного деривата подвергали хроматографическому разделению. ГАМК, аспартат, глутамат, таурин, глицин в начальной концентрации 0.1 мкМ/мл в 0.1 н HClO_4 использовали в качестве стандартной смеси для калибровки. Регистрацию продуктов разделения проводили на хроматографес флуоресцентным детектором Agilent 1100 (США) с аналитической колонкой HYPERSIL ODS (4.6×250 мм, 5 мкм) (длина волны возбуждения — 230 нм, длина волны испускания — 392 нм). Подвижная фаза для определения нейромедиаторных аминокислот состояла из 0.06 М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0032 М Na_2HPO_4 , 0.025 мМ ЭДТА, и 1.24 мМ CH_3OH , рН = 5.6. Скорость подвижной фазы составляла 1.5 мл/мин. Регистрация образцов проводилась с применением аппаратно-программного комплекса Agilent ChemStation v.B.04.02

После проверки на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка, достоверность отличий между группами определяли методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Ньюмана–Кейлса, используя в качестве анализируемых факторов “пол” животных и “наследственность” (GraphPad Prism 8.0, GraphPad Software, Inc. USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке поведения крыс К и А в тесте ПКЛ не установлено влияние фактора “Наследственность” на время пребывания в открытых рукавах лабиринта ($F(1, 31) = 1.281$ $P = 0.2664$), общее число заходов в рукава ($F(1, 35) = 0.2892$ $P = 0.5941$), число выходов в открытые рукава ($F(1, 35) = 0.6436$ $P = 0.4278$), свешивание головы ($F(1, 35) = 0.005244$ $P = 0.9427$). Фактор “Пол” статистически значимо влиял на время пребывания в открытых рукавах ($F(1, 31) = 28.76$ $P < 0.0001$), общее число заходов в рукава ($F(1, 35) = 22.37$ $P < 0.0001$), число выходов

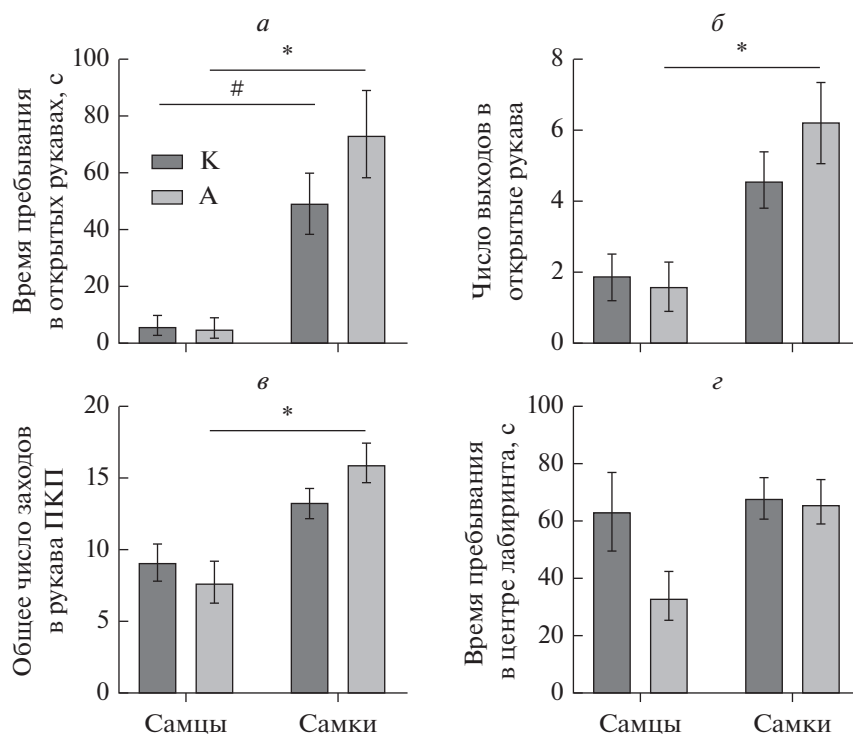


Рис. 1. Влияние наследственности и пола животных на поведение в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”. $M \pm SEM$. Примечание: * $p < 0.05$ по отношению к группе “Самцы, А”; # $p < 0.05$ по отношению к группе “Самцы, К”, согласно двухфакторному дисперсионному анализу (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Ньюмана–Кейлса.

в открытые рукава ($F(1, 35) = 19.74$ $P < 0.0001$), свешивание головы ($F(1, 35) = 10.15$ $P = 0.0030$), но не влиял на время пребывания в центре ПКЛ, также не установлено взаимодействия факторов “Наследственность” и “Пол” в отношении поведения в ПКЛ. При последующем множественном

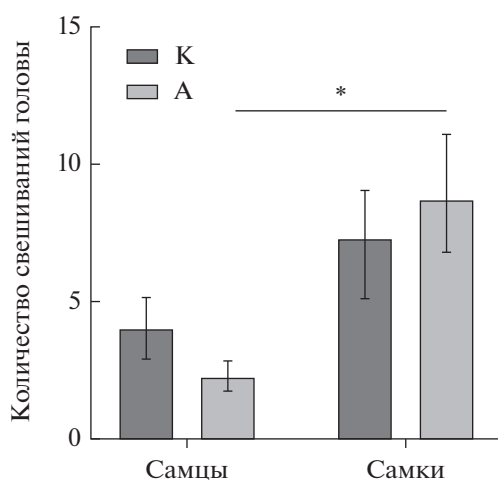


Рис. 2. Влияние наследственности и пола животных на количество свешиваний головы в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”. $M \pm SEM$. Примечание: * $p < 0.05$ по отношению к группе “Самцы, А”.

сравнении зарегистрировано статистически значимое увеличение времени пребывания (в 3 и в 3.9 раз) и количества заходов в открытые рукава (в 2.4 и в 3.9 раз), а также увеличение числа заходов в рукава (в 1.5 и в 2 раза) у самок, потомков интактных крыс и крыс, хронически употреблявших алкоголь, соответственно по сравнению с самцами (рис. 1), также у самок, потомков крыс, хронически употреблявших алкоголь установлено увеличение количества свешиваний головы в 3.8 раз по сравнению с самцами (рис. 2), что согласуется с данными литературы [19, 20].

При анализе результатов нейрохимических исследований наиболее выраженные изменения в содержании моноаминов и их метаболитов были выявлены в островковой коре. Фактор “Наследственность” оказывал существенное влияние на изменение содержания ДОФУК ($F(1, 33) = 6.598$ $P = 0.0149$), ДА ($F(1, 33) = 6.463$ $P = 0.0159$) и на внеклеточный оборот дофамина (3-МТ/ДА) ($F(1, 32) = 10.31$ $P = 0.0030$). Фактор “Пол” также влиял на содержание ДОФУК ($F(1, 33) = 9.826$ $P = 0.0036$), ДА ($F(1, 33) = 7.522$ $P = 0.0098$), 3-МТ ($F(1, 35) = 6.025$ $P = 0.0192$) и на оборот дофамина (ДОФУК/ДА) ($F(1, 30) = 6.342$ $P = 0.0174$). Установлено взаимодействие факторов “Наследственность” и “Пол” на содержание ДОФУК ($F(1, 33) = 10.34$ $P = 0.0029$) и ДА ($F(1, 33) = 7.702$ $P = 0.0090$). При последующем множественном

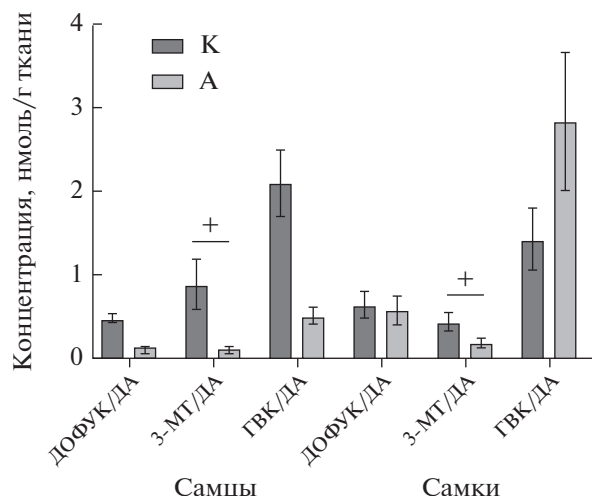


Рис. 3. Влияние наследственности животных на содержание нейромедиаторных моноаминов у самцов и самок в островковой коре. $M \pm SEM$. Примечание: + $p < 0.05$ по отношению к группе “К”, согласно двухфакторному дисперсионному анализу (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Ньюмана–Кейлса.

сравнении отмечалось статистическое значимое увеличение содержания ДОФУК и ДА у самцов А по сравнению с самцами К (в 2.6 и в 9.5 раз) и самками А (в 2.7 и в 12.7). По сравнению с животными К внеклеточный оборот дофамина был снижен у обоих полов потомства крыс, потребляв-

ших алкоголь (в 8.8 раз у самцов и в 2.5 раза у самок, соответственно). Также следует отметить разнонаправленное изменение суммарного оборота ДА (после воздействия ферментов МАО-Б и КОМТ): у самцов группы А показатель скорости метаболизма ГВК/ДА был снижен (в 4.15 раза) по сравнению с самцами К, в то время как у самок А, напротив, оборот ГВК/ДА был увеличен (в 2 раза) по сравнению с самками К (рис. 3).

Статистически достоверных изменений содержания аминокислот в островковой коре не было выявлено ни у одной из групп экспериментальных животных (рис. 4).

В ППК не выявлено статистических значимых изменений в содержании моноаминов, метаболитов и показателей их утилизации (рис. 5), однако, установлено, что фактор “Наследственность” существенно влиял на содержание глицина ($F(1, 35) = 6.804$, $P = 0.0133$). Фактор “Пол” не оказывал значимого эффекта на содержание глицина ($F(1, 35) = 0.04812$, $P = 0.8276$), также не установлено взаимодействия факторов “Наследственность” и “Пол” в данной структуре мозга ($F(1, 35) = 2.988$, $P = 0.0927$). При последующем множественном сравнении содержание тормозной аминокислоты глицина было статистически значимо снижено (в 1.7 раз) у самок А по сравнению с самками контрольной группы К ($p < 0.05$) (рис. 6).

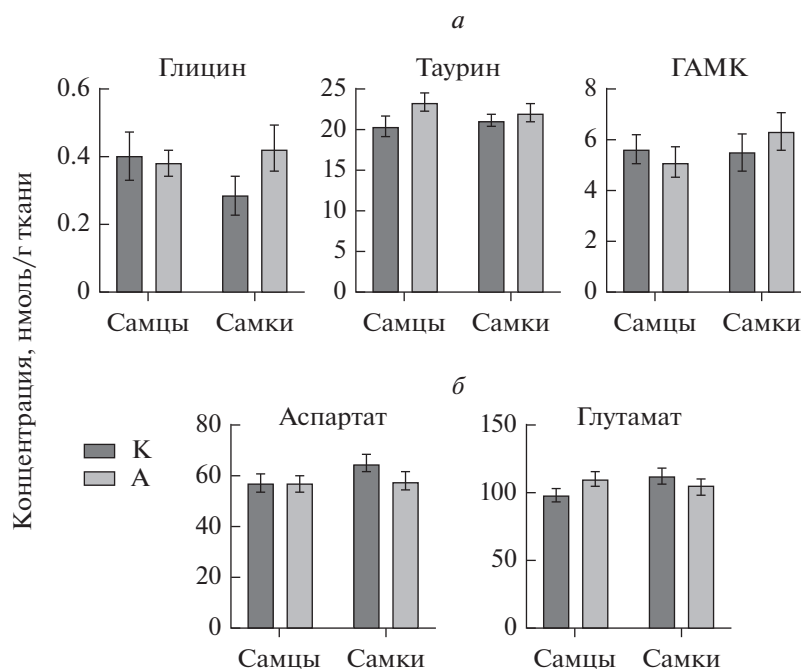


Рис. 4. Влияние наследственности животных на содержание тормозных (а) и возбуждающих (б) нейромедиаторных аминокислот у самцов и самок в островковой коре. $M \pm SEM$. Примечание: двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Ньюмана–Кейлса.

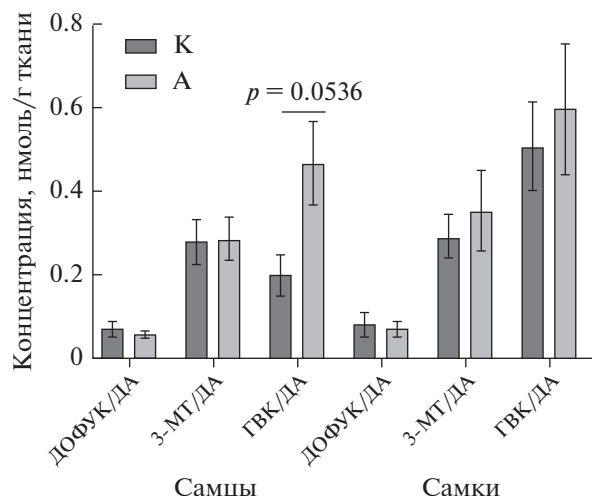


Рис. 5. Влияние наследственности животных на содержание нейромедиаторных моноаминов у самцов и самок в передней поясной коре. $M \pm SEM$. Примечание: двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Ньюмана–Кейлса.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несколько десятилетий изучения патогенетических последствий женского алкоголизма показало, что употребление алкоголя матерью в критические периоды развития мозга плода приводит к разрушительным долгосрочным последствиям для ко-

гнитивных функций и социального поведения. Однако, мало известно о последствиях употребления алкоголя родителями вне гестационного периода для алкоголь-зависимых эпигенетических модификаций, которые впоследствии могут проявляться в виде фенотипических изменений у потомства.

В настоящей работе использовали не подвергавшееся воздействию этанола в пренатальный и постнатальный период развития потомство от крыс, употреблявших алкоголь, начиная с 60-го дня жизни в течение 30-ти недель.

Согласно экспериментальным данным, воздействие алкоголя на крыс-самцов до спаривания вызывает у потомства зависимые от пола нарушения в поведении [21], рабочей и пространственной памяти [22], а также чувствительности к этанолу [23]. В данной работе выявлено влияние потребления этанола крысами на уровень тревожности их потомства. Самки проводили больше времени в открытых рукавах по сравнению с самцами, что свидетельствует об их меньшем уровне тревожности по сравнению с самцами и согласуется с данными литературы [19, 20], хотя выявленные половые отличия могут отражать различия в метаболизме [24].

Нейротрансмиттерные моноамины и аминокислоты в различных областях коры головного мозга играют важную роль в координации поведенческих и физиологических реакций на стресс,

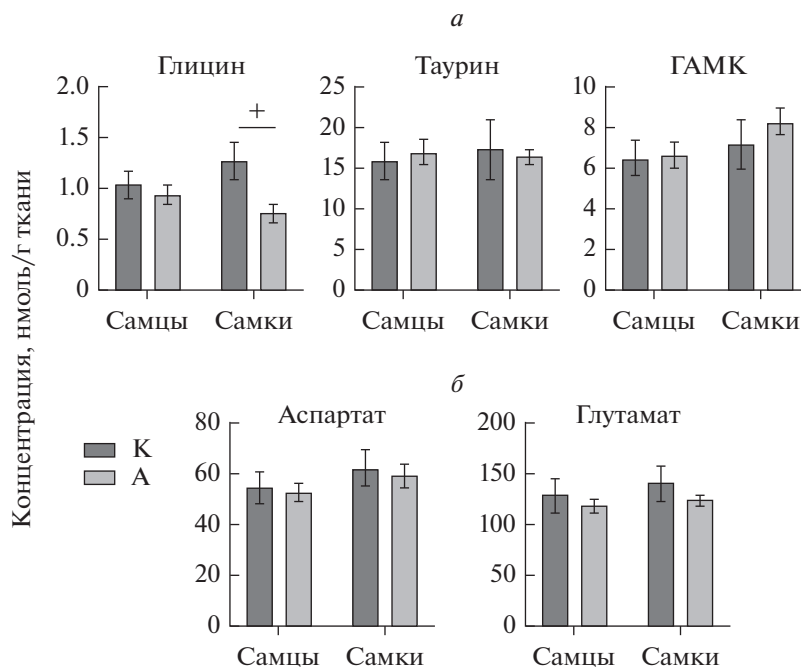


Рис. 6. Влияние наследственности животных на содержание тормозных (а) и возбуждающих (б) нейромедиаторных аминокислот у самцов и самок в передней поясной коре. $M \pm SEM$. Примечание: + $p < 0.05$ по отношению к группе "К", согласно двухфакторному дисперсионному анализу (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Ньюмана–Кейлса.

а также в адаптивном поддержании гомеостаза. Дофамин опосредует усиливающие эффекты психоактивных веществ, включая алкоголь, и способствует выбору действий, направленных на поиск и прием психоактивных веществ [25, 26]. В островковой коре выявлено снижение оборота дофамина (3-МТ/ДА) у крыс обоих полов, чьи родители подверглись хроническому воздействию этанола, однако только у самцов отмечалось повышенное содержание ДОФУК и ДА. Как указывалось выше, эти нейрохимические изменения сопровождаются повышенной тревожностью самцов, что, по-видимому, связано с регулированием островковой корой interoцептивной реакции. Известно, что дофаминергическая система участвует в interoцепции, которая способствует осознанию негативных эмоциональных состояний [27]. Предполагается, что островковая кора интегрирует информацию о внутренней репрезентации эффектов психоактивных веществ, полученную из вентромедиальной префронтальной коры, с информацией о внешних стимулах, полученных из ППК [28].

Содержание тормозной аминокислоты глицина у самок потомков крыс, на которых было оказано воздействию этанола, было снижено по сравнению с контрольной группой, что может отчасти объяснить повышенную активность животных в тесте ПКЛ, учитывая роль глицина в формировании тревожной реакции [29]. Известно, в частности, о ключевой роли этого нейротрансмиттера, которую он играет в тормозных синапсах спинного мозга, ствола мозга и мозжечка и в возбуждающих синапсах всего мозга, являясь необходимым коагонистом глутамата в N-метил-D-аспаратных рецепторах [30].

Расширение представлений о роли островковой коры в формировании тревожности требует продолжения изучения на лабораторных животных, которые в настоящее время ограничиваются тремя работами на крысах. Согласно Li et al. (2014), воздействие на м-холинергическую систему островковой коры крыс модулирует тревожно-подобное поведение в ПКЛ [31]. Rojas et al. (2015) показали, что адренергическая активность в островковой коре изменяет вызванное возбуждением увеличение неophobia (или гипонеофагии), которая рассматривается как еще один показатель тревожного поведения у крыс [32]. Кроме того, методом микроинъекции антагониста ГАМК-рецепторов для активации и антагониста глутаматергических AMPA-рецепторов для инактивации была обнаружена функциональная гетерогенность островковой коры у крыс в условиях стрессовой ситуации, при этом было показано, что роstralные области отвечают за анксиогенную реакцию, в то время как медиальные и каудальные области связаны с реализацией анксиолитической активности [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных нами исследований позволяют говорить о том, что поведенческие показатели реакции на стресс интактного потомства первого поколения от крыс, подвергавшихся хроническому действию раствора этанола до спаривания, не отличаются от аналогичных параметров потомства от крыс, не имевших доступа к этанолу. Зарегистрировано снижение внеклеточного оборота дофамина в островковой коре у самок и самцов от крыс, подвергавшихся хроническому воздействию этанола, а также снижение содержания глицина в ППК у самок от крыс, потреблявших алкоголь. Полученные данные указывают на определенную роль отдельных корковых структуры мозга в формировании особенностей мотивационного поведения у потомства алкоголизированных крыс обоих полов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках финансирования по теме № 0521-2019-0006.

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. Hairston I.S., Conroy D.A., Heitzeg M.M., Akbar N.Z., Brower K.J., Zucker R.A. // J. Sleep Research. 2016. V. 25. № 3. P. 341–349.
2. Hill S.Y., Tessner K.D., McDermott M.D. // J. Psychiatric Research. 2011. V. 45. № 3. P. 285–294.
3. Sundquist J., Sundquist K., Ji J. // eLife. 2014. V. 3. E02917.
4. Asimes A., Torcaso A., Pinceti E., Kim C.K., Zeleznik-Le N.J., Pak T.R. // Alcohol. 2017. V. 60. P. 179–189.
5. Asimes A., Kim C.K., Cuarenta A., Auger A.P., Pak T.R. // J. Endocrine Society. 2018. V. 2. № 7. P. 672–686.
6. Crews F.T., Vetreno R.P., Broadwater M.A., Robinson D.L. // Pharmacol Rev. 2016. V. 68. № 4. P. 1074–1109.
7. Trantham-Davidson H., Centanni S.W., Garr S.C., New N.N., Mulholland P.J., Gass J.T., Glover E.J., Floresco S.B., Crews F.T., Krishnan H.R., Pandey S.C., Chandler L.J. // Neuropsychopharmacology. 2017. V. 42. № 5. P. 1024–1036.
8. Tovote P., Fadok J.P., Luthi A. // Nat. Rev. Neurosci. 2015. V. 16. P. 317–331.
9. Damsa C., Kosel M., Moussally J. // Curr. Opin. Psychiatry. 2009. V. 22. P. 96–110.

10. Drouman V., Read S.J., Bechara A. // Trends Cogn. Sci. 2015. V. 19. № 7. P. 414–420.
11. Betka, S., Harris L., Rae C., Palfi B., Pfeifer G., Sequeira H., Duka T., Critchley H. // Psychopharmacology. 2019. V. 236. № 9. P. 2579–2591.
12. Szekely A., Siltan R.L., Heller W., Miller G.A., Mohanty A. // Soc. Cogn. Affect. Neurosci. 2017. V. 12. № 3. P. 476–486.
13. Grüsser S.M., Wrase J., Klein S., Hermann D., Smolka M.N., Ruf M., Weber-Fahr W., Flor H., Mann K., Braus D.F., Heinz A. // Psychopharmacology. 2004. V. 175. P. 296–302.
14. Przybycien-Szymanska M.M., Rao Y.S., Prins S.A., Pak T.R. // PLoS One. 2014. V. 9. № 2. E89320.
15. Rompala G.R., Finegersh A., Homanics G.E. // Alcohol. 2016. V. 53. P. 19–25.
16. Pellow S., Chopin P., File S., Briley M. // J. Neuroscience Methods. 1985. V. 14. P. 149–167.
17. Надорова А.В., Колик Л.Г., Клодт П.М., Наркевич В.Б., Наплекова П.Л., Козловская М.М., Кудрин В.С., Середенин С.Б. // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 2. С. 1–7.
18. Колик Л.Г., Надорова А.В., Коньков В.Г., Наркевич В.Б., Кудрин В.С. // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 2. С. 1–9.
19. Albrechet-Souza L., Schratz C.L., Gilpin N.W. // Biol. Sex. Differ. 2020. V. 11. № 27. P. 11.
20. Scholl J., Afzal A., Fox L., Watt M., Forster G. // Physiology & Behavior. 2019. V. 211. E112670.
21. Rompala G.R., Finegersh A., Homanics G.E. // Alcohol. 2016. V. 53. P. 19–25.
22. Yohn N.L., Bartolomei M.S., Blendy J.A. // Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2015. V. 118. № 1–2. P. 21–33.
23. Finegersh A., Homanics G.E. // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. E99078.
24. Johnston A.L., File S.E. // Physiol. Behav. 1991. V. 49. P. 245–250.
25. Nutt D.J., Lingford-Hughes A., Erritzoe D., Stokes P.R. // Nat. Rev. Neurosci. 2015. V. 16. № 5. P. 305–312.
26. Lüscher C. // Annu. Rev. Neurosci. 2016. V. 39. P. 257–276.
27. Koob G.F., Volkow N.D. // Lancet Psychiatry. 2016. V. 3. № 8. P. 760–773.
28. Parkes S.L., Bradfield L.A., Balleine B.W. // Neurosci. 2015. V. 35. № 16. P. 6464–6471.
29. Ketenci S., Acet N.G., Sarıdoğan G.E., Aydın B., Cabadak H., Gören M.Z. // Clin. Psychopharmacol. Neurosci. 2020. V. 18. № 2. P. 219–230.
30. Cummings K.A., Popescu G.K. // J. Gen. Physiol. 2015. V. 145. № 6. P. 513–527.
31. Li H., Chen L., Li P., Wang X., Zhai H. // Behav. Brain Res. 2014. V. 270. P. 256–260.
32. Rojas S., Diaz-Galarce R., Jerez-Baraona J.M., Quintana-Donoso D., Moraga-Amaro R., Stehberg J. // Front. Behav. Neurosci. 2015. V. 9. P. 164.
33. Méndez-Ruette M., Linsambarth S., Moraga-Amaro R., Quintana-Donoso D., Méndez L., Tamburini G., Cornejo F., Torres R.F., Stehberg J. // Front. Physiol. 2019. V. 10. P. 330.

Neurochemical Changes in the Insular Cortex and Anterior Cingulate Cortex in Intact Males and Females of the First Generation of Rats Exposed to Chronic Ethanol Consumption

V. G. Konkova^a, V. S. Kudrin^a, V. B. Narkevich^a,
A. O. Efimova^a, T. D. Nikiforova^a, and L. G. Kolik^a

^a FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russia

Alcohol-related mental health problems, including an increased risk of developing anxiety-depressive disorders and alcohol addiction, are often passed down from generation to generation. Currently, there are no studies that consider the effect of prolonged alcohol exposure on the content of neurotransmitter monoamines and neurotransmitter amino acids in the brain structures responsible for the formation of emotional and motivational behavior patterns in the first F1 generation in the absence of direct alcohol exposure to the fetus. The aim of the present work was to study the anxiety behavior and neurochemical changes in the insular cortex and anterior cingulate cortex (ACC) in intact offspring of rats that consumed ethanol solution for 30 weeks before mating. In the “elevated plus maze” test, females spent more time in open arms compared to males, however, no significant differences in the stress response between the offspring of rats exposed to and not exposed to ethanol were found. In ex vivo experiments in the insular cortex there was a decrease in the turnover of extracellular dopamine in animals of both sexes ($p < 0.05$) and multidirectional shifts in the total turnover of dopamine in the absence of changes in the content of neurotransmitter amino acids. In the ACC, a decrease in the glycine content ($p < 0.05$) was observed only in females. The data obtained indicate the effect of ethanol with prolonged administration on sex-dependent changes in the content of neurotransmitter monoamines and amino acids in the brain structures that determine the formation of emotional and motivational behavior in previously unaffected offspring.

Keywords: ethanol, rats, offspring, HPLC, elevated plus maze, anxiety, insular cortex, anterior cingulate cortex, monoamine neuromediators, amino acid neuromediators