СОДЕРЖАНИЕ

Юбилей	
Юбилей академика Александра Даниловича Ноздрачева	1191
Экспериментальные статьи	
Индуктор шаперонов U133 устраняет ангедонию и препятствует развитию нейродегенерации в моноаминергических эмоциогенных структурах головного мозга в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у пожилых крыс	
И. В. Екимова, М. Б. Пази, С. Г. Полоник, Д. В. Белан, Ю. Ф. Пастухов	1194
Нейрохимические особенности нейропептид-Y-ергических энтеральных нейронов подслизистого сплетения тонкой кишки в постнатальном онтогенезе П. М. Маслюков, А. Ф. Будник, П. А. Вишнякова, А. В. Павлов	1209
Амигдалофугальная модуляция висцеральной ноцицептивной трансмиссии в каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга крысы в норме и при кишечном воспалении	
О. А. Любашина, И. Б. Сиваченко, И. И. Бусыгина	1219
Влияние высокофруктозной диеты на физиологические, биохимические и морфологические показатели самок крыс нокаутной линии TAAR9-KO С. А. Апрятин, И. С. Жуков, А. Л. Манасян, Р. З. Муртазина, Т. А. Хунагов, А. И. Лезина, В. М. Клименко	1235
Мезенхимальные стволовые клетки и активация репаративных процессов в мозге и сетчатке В. А. Кульчицкий, А. С. Замаро, Ю. Г. Шанько, В. М. Рубахова	1250
Реакции нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у крыс линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс-эпилепсии Д. А. Цветаева, В. В. Раевский	1264
Является ли тиролиберин интегратором пролактин- и окситоцин-зависимых процессов в молочной железе и родительского поведения во время лактации у мышей? А. Г. Марков, Л. В. Шадрин, Н. М. Круглова, А. А. Федорова,	
И. А. Разговорова, М. П. Чернышева	1274
Реорганизация сети интернейронов, экспрессирующих парвальбумин, в неокортексе крыс после перинатальной гипоксии и возможность ее фармакологической коррекции	4000
Л. И. Хожай, В. А. Отеллин	1289
Характеристики ЭЭГ и уровень тревожности испытуемых с разной успешностью восстановления психомоторной деятельности при пробуждении во время дневного сна <i>Е. А. Черемушкин, Н. Е. Петренко, В. Б. Дорохов</i>	1299
Влияние пренатального стресса на репродуктивные функции самцов крыс	1277
С. Г. Пивина, В. В. Ракицкая, В. К. Акулова, Г. И. Холова, Е. Д. Шигалугова, Н. Э. Ордян	1310

Anniversary

Anniversary of Academician Alexander Danilovich Nozdrachev		
Experimental Articles		
The Chaperone Inducer U133 Eliminates Anhedonia and Prevents the Development of Neurodegeneration in Monoaminergic Emotionogenic Structures of the Brain in a Model of the Preclinical Stage of Parkinson's Disease in Elderly Rats I. V. Ekimova, M. B. Pazi, S. G. Polonik, D. V. Belan, and Yu. F. Pastukhov	1194	
Neurochemical Features of the Neuropeptide Y-Ergic Enteric Submucous Neurons of the Small Intestine in Postnatal Ontogenesis P. M. Masliukov, A. F. Budnik, P. A. Vishnyakova, and A. V. Pavlov	1209	
Amygdalofugal Modulation of Visceral Nociceptive Transmission in the Rat Caudal Ventrolateral Medulla in Normal Conditions and under Intestinal Inflammation O. A. Lyubashina, I. B. Sivachenko, and I. I. Busygina	1219	
Investigation of a High-Fructose Diet on Physiological, Biochemical and Morphological Parameters of TAAR9-KO Female Knockout Rats S. A. Apryatin, I. S. Zhukov, A. L. Manasyan, R. Z. Murtazina, T. A. Khunagov, A. I. Lezina, and V. M. Klimenko	1235	
Mesenchymal Stem Cells and Activation of Reparative Processes in Brain and Retina V. A. Kulchitsky, A. S. Zamaro, Y. G. Shanko, and V. M. Rubakhova	1250	
Responses of Somatic-Sensory Cortical Neurons to Vibrissae Area Stimulation in WAG/Rij Rats, Genetically Predisposed to Absence Epilepsy D. A. Tsvetaeva, and V. V. Raevsky	1264	
Is Thyroliberin an Integrator of Prolactin- and Oxytocin-Dependent Processes in the Breast and Parental Behavior during Lactation in Mice? A. G. Markov, L. V. Shadrin, N. M. Kruglova, A. A. Fedorova, I. A. Razgovorova, and M. P. Chernysheva	1274	
Reorganization of a Network of Interneurons Expressing Parvalbumin in the Rat's Neocortex after Perinatal Hypoxia and the Possibility of Its Pharmacological Correction L. I. Khozhai and V. A. Otellin	1289	
EEG Characteristics and the Level of Anxiety of Tests with Different Successes of Restoring Psychomotor Activities during Waking Up during Daily Sleep E. A. Cheremushkin, N. E. Petrenko, and V. B. Dorokhov	1299	
The Effect of Prenatal Stress on the Reproductive Functions of Male Rats S. G. Pivina, V. V. Rakitskaya, V. K. Akulova, G. I. Kholova, E. D. Shigalugova, and N. E. Ordyan	1310	

= ЮБИЛЕЙ =

ЮБИЛЕЙ АКАДЕМИКА АЛЕКСАНДРА ДАНИЛОВИЧА НОЗДРАЧЕВА

DOI: 10.31857/S0869813921100113



Академик Александр Данилович Ноздрачев — ведущий отечественный физиолог, связавший свою научную деятельность с Институтом физиологии им. И.П. Павлова и педагогическую деятельность — с Санкт-Петербургским государственным университетом. Он и его ученики внесли значительный вклад в изучение физиологии автономной нервной системы. В октябре 2021 г. Александру Даниловичу исполняется 90 лет, и он сохраняет оптимизм, любовь к людям и страсть к науке.

Александр Данилович родился в г. Карачеве Орловской (ныне Брянской) области в семье инженера-геофизика. Его детство и юность пришлись на трудные годы в истории нашей Родины. На 106-й день Великой отечественной войны оказался в оккупации, дважды бежал из угоняемых немцами этапов. Военное и послевоенное время сформировало в нем стойкость и упорство, желание добиться в жизни своих целей.

После войны он поступил в Витебский ветеринарный институт, окончил его с отличием и был рекомендован в аспирантуру, которую проходил в Ленинградском институте усовершенствования ветеринарных врачей на кафедре топографической анатомии и оперативной хирургии. После защиты кандидатской диссертации (1957 г.) работал в Отделе сравнительной физиологии нервной деятельности Института экспериментальной медицины под руководством академика АМН СССР Дмитрия Андреевича Бирюкова. Молодому кандидату наук было поручено изучение только что возникшего "серотонинергического" направления. Он стоял у истоков разви-

1192 ЮБИЛЕЙ

тия в нашей стране направления по изучению роли серотонина в межнейронной и нейроэффекторной передаче.

В сентябре 1960 г. Александр Данилович перешел в Институт физиологии им. И.П. Павлова АН СССР по приглашению директора академика В.Н. Черниговского. С тех пор он трудится в этом институте, возглавляя с 1974 г. лабораторию физиологии висцеральных систем, а затем лабораторию интероцепции. Владея оперативным хирургическим мастерством, Александр Данилович разработал и внедрил в экспериментальную практику метод вживления погружных электродов в периферические нервные проводники в сочетании с локальным обратимым выключением в них проводимости. Этот метод позволяет в условиях хронического проведения эксперимента надежно регистрировать поток сенсорной или моторный импульсации. Электрофизиологический анализ компонентов импульсных потоков в условиях бодрствования дал возможность подробно рассмотреть особенности сенсорной и моторной активности структур при разных функциональных нагрузках в естественных условиях.

Основным направлением научной деятельности А.Д. Ноздрачева является изучение физиологии автономной нервной системы. Он выдвинул и экспериментально обосновал ряд положений о принципах организации и деятельности одного из ее отделов в стенках полых внутренних органов — метасимпатического. Основываясь на результатах вне- и внутриклеточных нейрональных исследований, он определил и экспериментально охарактеризовал главные элементы ее построения: чувствительное, вставочное и двигательное звенья. Установил характерный для этой системы модульный принцип организации и относительную независимость от других отделов нервной системы.

Немалым событием в его жизни явилось приглашение возглавить кафедру физиологии человека и животных Ленинградского (в то время) государственного университета. 29 декабря 1980 г. он был избран заведующим кафедрой и руководил ее коллективом без малого 30 лет. В настоящее время он остается действующим профессором кафедры общей физиологии (современное название кафедры), передавая свой опыт новым поколениям физиологов. Александр Данилович возглавил работу по созданию учебников по физиологии. Он и его коллеги выпустили вузовские учебники "Общий курс физиологии", "Начала физиологии", "Нормальная физиология", "Большой практикум по физиологии человека и животных".

Особый интерес в исследовании истории российской физиологии Александр Данилович уделил Ивану Петровичу Павлову. К 100-летию присуждения И.П. Павлову Нобелевской премии академик Ноздрачёв совместно с соратниками выпустил издание "Нобелевские премии по физиологии или медицине за 100 лет", а также трехтомник, включающий "Нобелевскую эпопею И.П. Павлова", "Павлов без ретуши. Мемуары С.В. Павловой, А.Ф. Павлова, М.К. Петровой", "Ученики и последователи И.П. Павлова". В 2011 г. А.Д. Ноздрачёвым с коллегами создана также и двухтомная "Павловская энциклопедия. Люди, События, Факты".

В своей общественной жизни Александр Данилович подает яркий пример активной гражданской позиции. В течение более 20 лет он возглавлял Президиум и Совет уникального учреждения РАН — первого Клуба научной интеллигенции России — Санкт-Петербургского Дома ученых им. М. Горького РАН, предложил и осуществил установку первого в Санкт-Петербурге памятника академику И.П. Павлову. Он также был инициатором создания на территории Университета памятника Кошке как экспериментальному животному, благодаря которому были сделаны многие открытия в физиологии.

Научные и педагогические заслуги А.Д. Ноздрачева получили достойную оценку. В 1994 г. за цикл работ по физиологии автономной нервной системы он был удостоен Государственной премии России, в 2000 и в 2005 гг. — премиями прави-

ЮБИЛЕЙ 1193

тельства РФ, а в 2006 г. — премии им. И.П. Павлова Правительства Санкт-Петербурга и С.-Петербургского Научного центра РАН. За цикл работ "Механизмы нервной регуляции висцеральных функций" ему была присуждена Золотая медаль им. И.П. Павлова РАН (2006). В 1991 г. он был избран членом-корреспондентом, а в 1997 г. — действительным членом РАН. Александр Данилович является почетным профессором ряда университетов России.

Заслуженный авторитет и весомые научные регалии не мешают Александру Даниловичу Ноздрачёву на протяжении всей научной жизни оставаться доступным, легким в общении и жизнерадостным человеком. Коллектив Института физиологии им. И.П. Павлова и Кафедры общей физиологии Санкт-Петербургского государственного университета, редакция журнала, друзья и коллеги сердечно поздравляют Александра Даниловича с юбилеем! Желаем юбиляру и впредь радовать коллег новыми достижениями, блеском мысли, остроумием, любовью к людям и к жизни!

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ИНДУКТОР ШАПЕРОНОВ U133 УСТРАНЯЕТ АНГЕДОНИЮ И ПРЕПЯТСТВУЕТ РАЗВИТИЮ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА В МОДЕЛИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У ПОЖИЛЫХ КРЫС

© 2021 г. И. В. Екимова $^{1, *}$, М. Б. Пази $^{1, **}$, С. Г. Полоник 2 , Д. В. Белан 1 , Ю. Ф. Пастухов 1

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

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

*E-mail: irina-ekimova@mail.ru

** E-mail: pazi.mari@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2021 г. После доработки 07.04.2021 г. Принята к публикации 08.04.2021 г.

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание преимущественно пожилых людей, которое до сих пор относится к числу неизлечимых. На сегодняшний день эффективные нейропротекторы, пригодные для лечения пациентов с БП, отсутствуют. Ранее нами показано, что проведение терапии с препаратом U133, индуцирующим синтез белков теплового шока Hsp70 и HSP40 в головном мозге, препятствует развитию нейродегенерации в нигростриатной системе и устраняет нарушения сна при моделировании БП у животных. В данном исследовании мы оценили антидепрессантные свойства превентивной терапии с U133, а также ее нейропротективные эффекты на моноаминергические эмоциогенные структуры головного мозга на модели доклинической стадии БП у пожилых крыс Вистар (20 мес.), созданной с помощью интраназального введения ингибитора протеасом лактацистина. В работе показано, что внутрибрющинное введение U133 пожилым животным приводит к отставленному во времени (через 3-7 сут) повышению уровня Hsp70 (HSPA1) в вентральной области покрышки среднего мозга и голубом пятне. Проведение превентивной терапии с U133 устраняло признаки депрессивно-подобного поведения в виде симптома ангедонии, формирующегося в динамике доклинической стадии БП у пожилых крыс. Выяснено, что антидепрессант-подобный эффект индуктора шаперонов U133 обусловлен способностью шаперона Hsp70 ослаблять процесс нейродегенерации и нейровоспаления в дофаминергической мезолимбической системе вознаграждения и норадренергической системе голубого пятна. Полученные данные являются фундаментальным обоснованием для разработки новой молекулярной технологии превентивной терапии БП и ангедонии различного генеза на основе индукторов шаперонов.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, лактацистин, соединение U133, ангедония, нейродегенерация, нейровоспаление, вентральная область покрышки среднего мозга, голубое пятно, пожилые крысы

DOI: 10.31857/S0869813921100046

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) — мультисистемное хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое занимает второе место по частоте встречаемости после болезни Альцгеймера. Вероятность наступления БП повышается в геометрической прогрессии с возрастом у лиц старше 65 лет [1]. Это может свидетельствовать о том, что старение, в комбинации с генетическими факторами и факторами окружающей среды, предрасполагает к развитию этого типа болезни [2]. В связи с увеличением продолжительности жизни прогнозируется, что в течение ближайших 20—30 лет число пациентов с БП возрастет почти 2 раза [3].

БП проявляется классической триадой моторных нарушений в виде симптомов гипокинезии, мышечной ригидности, тремора покоя. Эти симптомы лежат в основе диагностики БП и возникают в результате прогрессирующей гибели большей части дофамин (ДА)-ергических нейронов в черной субстанции, которые не восстановить, и полное излечение в этой стадии уже невозможно. У большинства пациентов моторные симптомы сочетаются с нарушением сна, эмоциональными расстройствами и когнитивным дефицитом, которые могут опережать на несколько лет и более моторные проявления заболевания [4—8]. Широкий спектр немоторных нарушений связан с развитием нейродегенеративного процесса в экстранигральных структурах головного мозга, который зарождается в продромальный (доклинический) период развития БП [9].

Одним из наиболее частых и клинически значимых нервно-психических нарушений при БП является депрессия, которая встречается в среднем у 35% пациентов [8, 10]. Считается, что ДА-ергическая система, и, в частности, рецепторы D2, играют немаловажную роль не только в фундаментальных механизмах проявления симптомов депрессии, но и в формировании временной структуры депрессивных состояний [11, 12]. Среди характерных симптомов депрессии при БП отмечена ангедония (потеря чувства удовольствия и стремления к получению удовольствия), которая выявляется в среднем у 45.7% случаев БП и может коррелировать с другими признаками депрессии (апатия, повышенная тревожность, снижение работоспособности) [8]. Возникновение симптомов ангедонии у части пациентов БП может предшествовать моторным проявлениям БП в клинической стадии; больные с депрессивным расстройством имеют примерно в 2 раза больший риск развития БП в течение последующих 4-6 лет, чем группа контроля [8, 13]. Патофизиологические изменения в головном мозге, лежащие в основе ангедонии при БП, до сих пор неясны. Предполагается, что решающую роль в ее развитии при БП играет дисфункция моноаминергических восходящих систем вследствие нейродегенерации ДА-ергических нейронов ключевого компонента "системы вознаграждения" вентральной области (ВО) покрышки среднего мозга, а также отчасти норадренергических (НА) нейронов голубого пятна ствола головного мозга [14–16].

Для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями во всем мире активно разрабатываются принципы превентивной медицины, которые основаны как на доклиническом выявлении заболевания, так и на последующей нейропротективной терапии, способной реально предотвратить прогрессирование болезни и снизить инвалидность трудоспособного населения. Однако технологии доклинической идентификации и нейропротективной фармакотерапии БП еще не создано. С целью облегчения дифференциальной диагностики БП в сложных клинических случаях и для оценки степени нарушения функционального состояния ЦНС разрабатываются новые подходы для анализа свойств непроизвольных колебаний (тремора),

Список сокращений: HSP70 — белки теплового шока массой 70 кДа; PBS — апирогенный фосфатный буфер рН 7.4; БП — болезнь Паркинсона; BO — вентральная область [покрышки среднего мозга]; ДА — дофамин; ЛЦ — лактацистин; НА — норадреналин; $T\Gamma$ — тирозингидроксилаза; $Y\Pi C$ — убиквитинпротесомная система.

возникающих при выполнении человеком определенной двигательной задачи [17], а также различные нейровизуализационные методы исследования. Отсутствие на сегодняшний день эффективных нейропротекторов, пригодных для лечения пациентов с БП, частично связано с тем, что доклинические испытания ряда соединений проводились на животных молодого и среднего возраста в моделях БП. Для ускорения поиска эффективных нейропротективных соединений, которые можно применить на доклинической стадии БП, разрабатываются адекватные модели у пожилых животных.

В настоящее время общепризнано, что молекулярной основой развития нейродегенерации при БП является нарушение укладки белка α-синуклеина, приводящее к накоплению в нейронах его токсичных олигомеров [18]. Это происходит в результате недостаточной активности молекулярных механизмов конформационного контроля со стороны системы шаперонов HSP70 и деградации аномальных белков с помощью убиквитин-протеасомной системы (УПС) [19, 20]. Ранее в лаборатории впервые созданы модели доклинической стадии БП у крыс Вистар среднего и пожилого возраста на основе ослабления активности УПС. В этих моделях выявлен ряд признаков нарушений сна, депрессивно-подобного поведения и когнитивного дефицита, сигнализирующих о начавшихся патологических изменениях в головном мозге [2, 21-25]. В настоящее время стресс-индуцируемый шаперон Heat Shock Proteins 70 kDa (Hsp70), препятствующий неправильной укладке белков, а также его фармакологические индукторы, рассматриваются как перспективная нейропротективная стратегия при БП и других нейродегенеративных заболеваниях [26]. Апробированные индукторы Hsp70 природного и синтетического происхождения (селастрол, куркумин, вальпроевая кислота, гелданамицин, аримокломол и др.), наряду с достоинствами, обладают рядом недостатков (побочные токсические эффекты, плохая растворимость и проходимость через гематоэнцефалический барьер и др.) [26]. Поэтому поиск безопасных индукторов Hsp70 для лечения нейродегенеративных заболеваний активно продолжается. Недавно в нашей лаборатории оценен нейропротективный потенциал нового индуктора шаперонов хиноидного соединения U133 на моделях БП у животных. Выяснено, что соединение U133, вызывающее повышение синтеза Hsp70 и HSP40, препятствует развитию α-синуклеиновой патологии и нейродегенерации в нигростриатной системе и устраняет нарушения сна при моделировании доклинической и клинической стадий БП у крыс среднего и пожилого возраста [27, 28]. Какие изменения происходят при этом в проявлении признаков ангедонии и нейродегенерации в моноаминергических эмоциогенных структурах головного мозга, незвестно.

Задача настоящего исследования — выяснить, способен ли индуктор шаперонов U133 препятствовать развитию нейродегенеративного процесса в ДА-ергической мезолимбической системе и НА-ергической системе голубого пятна и тем самым устранять депрессивно-подобное поведение, формирующееся в доклинической стадии БП у пожилых крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Опыты проводились на крысах-самцах популяции Вистар пожилого возраста (20 мес.), массой тела 400-450 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария Института эволюционной физиологии и биохимии РАН по 5 особей в клетке при температуре окружающей среды $24\pm1^{\circ}\mathrm{C}$ и свободном доступе к воде и пище. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Ба-

зельской декларации и рекомендациям, принятым биоэтическим комитетом по охране животных Института эволюционной физиологии и биохимии РАН.

В опытах использовали индуктор шаперонов хиноидное соединение U133 (ацетилированный трис-O-глюкозид эхинохрома), которое было синтезировано в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН путем глюкозилирования эхинохрома (2,3,5,7,8-пента-гидрокси-1,4-нафтохинона) — природного пигмента морских ежей [29, 30]. Для оценки Hsp70-индуцирующей активности соединения U133, его растворяли в 20 мкл диметилсульфоксида (DMSO), доводили до объема 0.2 мл 0.9%-ным раствором NaCl и вводили животным (n = 15) внутрибрюшинно (в/б) в дозе 5 мг/кг. Контрольным крысам (n = 15) вводили в/б 0.2 мл 0.9%-ный раствор NaCl с добавлением 20 мкл DMSO. Содержание Hsp70 исследовали в ВО покрышки среднего мозга и голубом пятне через 1, 3, 7, 9 и 12 сут после введения 0.9%-ного раствора NaCl + DMSO (контрольная группа) и U133 (экспериментальная группа). В эксперименте было проанализировано пять групп животных в разных временных точках (1, 3, 7, 9 и 12 сут). В каждой временной точке было по 3 животных для якспериментальной.

Вестерн-блот

Изменение содержания Hsp70 в ВО покрышки среднего мозга и голубом пятне после введения U133 оценивали методом Вестерн-блот. Пробы тканей головного мозга лизировали с использованием High RIPA буфера и гомогенизировали. Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносили на PVDF-мембрану Immobilon-P (Millipore Corporation, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител полоски мембран инкубировали в блокирующем растворе (PBS с добавлением 0.1% Tween-20 и 3% бычьего сывороточного альбумина) в течение 1 ч. Для иммуномечения применяли первичные моноклональные антитела мыши к индуцибельному белку Нѕр70 (1 : 1000; Аьсат, Великобритания). В качестве контроля нагрузки использовали GAPDH (моноклональные антитела мыши, 1:1000; Аьсат, Великобритания). Визуализацию сигнала проводили с использованием протокола хемилюминесценции с применением реактива Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitogen, США). Анализ количества белка осуществляли с помощью денситометрии с использованием программы ImageJ. Уровень белка интереса Hsp70 был скорректирован по фоновому сигналу и нормирован на сигнал GAPDH.

Создание модели доклинической стадии БП

Для создания пролонгированной модели доклинической стадии БП у пожилых крыс использовали ранее разработанный протокол интраназального введения специфического ингибитора ферментативной активности протеасом лактацистина (ЛЦ; Епzo, США) [23]. ЛЦ растворяли в апирогенном фосфатном буфере (рН 7.4; PBS) и вводили крысам (n=8) интраназально в каждую ноздрю в дозе 100 мкг/8 мкл дважды с интервалом 7 дней. За два введения каждое животное получала 400 мкг ЛЦ. Контрольной группе животных (n=8) вводили растворитель ЛЦ интраназально (8 мкл PBS) и растворитель U133 в/б (0.2 мл 0.9%-ного раствора NaCl с добавлением 20 мкл DMSO).

Проведение терапии с индуктором шаперонов U133

Соединение U133 вводили крысам (n=8) в/б в дозе 5 мг/кг и объеме 0.2 мл 0.9%-ного раствора NaCl с добавлением 20 мкл DMSO трижды: через 4 ч после каждого введения ЛЦ, а также через 7 дней после последнего введения ЛЦ. Кон-

трольной группе животных (n=8) вводили 8 мкл PBS интраназально и в/б 0.2 мл 0.9%-ного раствора NaCl с добавлением 20 мкл DMSO.

Последующая оценка терапевтического эффекта соединения U133 проводилась в трех экспериментальных группах: 1. Контрольная группа (n=8). 2. Группа животных в модели доклинической стадии БП (n=8). 3. Группа животных в модели доклинической стадии БП, получавших терапию с U133 (n=8).

Тест на предпочтение сахарозы

Для выявления симптома ангедонии был проведен тест на предпочтение сахарозы по стандартной методике [31] в модификации. Для определения базального уровня предпочтения сахарозы проводили фоновое тестирование за 2 дня до начала эксперимента. Экспериментальное тестирование проводили через 21 день после первого введения ЛЦ. Во время проведения теста животные содержались в одиночных клетках при температуре окружающей среды $24 \pm 1^{\circ}$ С и фотопериоде 12:12 ч. Во избежание стрессирования животных, предварительной депривации воды или пищи не проводили. Животным в течение 24 ч предоставляли свободный доступ к двум идентичным шариковым поилкам объемом 200 мл, одна из которых содержала питьевую воду, вторая — 2%-ный раствор сахарозы в питьевой воде. Перед тестированием и после его окончания объем жидкостей (водопроводной воды и раствора сахарозы в воде) в поилках измеряли с помощью мерной колбы на 200 мл. Предпочтение сахарозы рассчитывали по формуле:

Предпочтение =
$$\frac{V_{\rm cax}}{V_{\rm cax} + V_{\rm воды}} \times 100\%,$$

где $V_{\rm cax}$ — объем выпитого раствора сахарозы; $V_{\rm воды}$ — объем выпитой воды.

Иммуногистохимическое исследование

После окончания теста на предпочтение сахарозы животных наркотизировали золетилом (Zoletil®; внутримышечно, 60 мг/кг) декапитировали и извлекали головной мозг. Головной мозг фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида при температуре 4°C в течение 5 дней, промывали в PBS и переносили в 20%-ный раствор сахарозы при температуре 4°C для криопротекции. Через 3-5 дней мозг замораживали в изопентане при температуре -45° C и хранили при -80° C. Чередующиеся серии фронтальных срезов вентрального стриатума и ВО покрышки среднего мозга (10 мкм) и голубого пятна (20 мкм) подготавливали на криостате Leica (Германия) в соответствии с атласом головного мозга крысы [32]. В работе использовали биотин-стрептавидиновый метод, описанный ранее [23, 27], с применением первичных кроличьих поликлональных антител против ТГ (1:700, Abcam, Великобритания), против Iba-1 (1: 200, Abcam, Великобритания) и вторичных биотинилированных антител против иммуноглобулинов кролика (1: 350, Vector Lab., США) и стрептавидин-пероксидазного комплекса (1:400, VectorLab, США). Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли негативным контролем без первичных или вторичных антител.

Изображения изучаемых структур головного мозга в проходящем свете получали с помощью микроскопа Carl Zeiss (Германия) со встроенной видеокамерой Imager 4.1, и программного обеспечения для захвата изображения AxioVision-4.7.2. (в јрд или tiff форматах). Подсчет количества иммунопозитивных к ТГ нейронов в ВО покрышки, их аксонов в вентральном стриатуме, НА-ергических нейронов в голубом пятне и Iba1-иммунопозитивных микроглиоцитов проводили визуальным методом с помощью программы PhotoM (http://www.t_lambda.chat.ru). По каждому животному анализировали 10—12 снимков ВО покрышки и голубого пятна на одном

уровне исследуемых зон от каждого животного, разделенных примерно 70-ю мкм. На снимке стандартной площадью, захватываемой камерой светового микроскопа, обводили ТГ-иммунопозитивные нейроны с видимым ядром. Количество клеток приходилось на стандартную площадь ткани, захватываемой камерой светового микроскопа. Для голубого пятна площадь составила 365 мм² (объектив ×20), вентральной области покрышки среднего мозга 1443 мм² (объектив ×10).

Определение количества выживших ТГ-иммунореактивных терминалей в вентральном стриатуме выполнялось с помощью программы ImageJ (NIH, США). По каждому животному сделано 4-5 микрофотографий для каждой из четырех условно-выделенных областей вентрального стриатума стандартной площадью 92 мм^2 (объектив $\times 40$). Результаты по изменению количества ДА-ергических нейронов и их аксонов представлялись в виде среднего арифметического $\pm m$.

Полуколичественный анализ оптической плотности ТГ-иммунореактивного вещества в нейронах ВО покрышки среднего мозга проводился с использованием программного обеспечения PhotoM. Иммунногистохимическую реакцию выполняли одновременно в контрольной и экспериментальной группах. От каждого животного анализировали по пять срезов на одном уровне исследуемых зон. На каждом снимке стандартной площадью 365 мм² (объектив ×20) обводили ТГ-иммунопозитивные нейроны с видимым ядром. Оптическая плотность, отражающая содержание иммунопозитивного вещества, рассчитывалась как разница между интенсивно окрашенными нейронами, содержащими иммунореактивное вещество, и интенсивностью окраски фона (не содержащего иммунореактивного вещества) на том же срезе. Результаты были представлены в относительных единицах оптической плотности на мкм².

Статистический анализ

Анализ всех полученных результатов осуществлялся с помощью программы Statistica 7.0. Нормальность распределения проверяли с помощью теста Колмогорова—Смирнова. Анализ данных, имеющих распределение, отличное от нормального, проводили с помощью непараметрического критерия Краскела—Уоллиса; в качестве post-hoc критерия применен ранговый критерий Ньюмана—Кейлса. Статистическую обработку данных, распределенных нормально, выполняли с помощью дисперсионного анализа ANOVA с последующим post-hoc анализом с помощью критерия Тьюки HSD. Различия результатов между группами считались статистически значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Системное введение соединения U133 повышает уровень Hsp70 в эмоциогенных структурах головного мозга

На первом этапе работы необходимо было оценить Hsp-70-индуцирующую активность соединения U133 в стареющем мозге у пожилых животных. Проведенное исследование показало, что после внутрибрюшинного введения U133 максимальное увеличение содержания белка Hsp70 в BO покрышки среднего мозга и голубом пятне отмечалось на 7-е сутки после инъекции; прирост Hsp70 в BO покрышки составил 121% ($p \le 0.05$), голубом пятне 33% ($p \le 0.05$) по сравнению с контролем. Повышенный уровень Hsp70 сохранялся в течение последующих 2-3 сут.

В верхней части рис. 1 представлены репрезентативные иммуноблоты вентральной области покрышки среднего мозга (VTA) и голубого пятна (Locus C.). На графике по вертикали — оптическая плотность Hsp70, % от контроля. ANOVA с после-

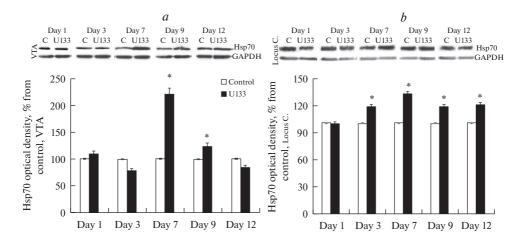


Рис. 1. Изменение содержания индуцибельного белка теплового шока Hsp70 в вентральной области покрышки среднего мозга (a) и голубом пятне (b) у пожилых крыс через 1, 3, 7, 9, 12 дней (Day 1, 3, 7, 9, 12) после внутрибрюшинного введения соединения U133.

дующим post-hoc анализом с помощью критерия Тьюки HSD. Достоверность различий в опыте относительно контроля *-p < 0.05.

Применение Hsp70-индуцирующей терапии с U133 устраняет признаки депрессивно-подобного поведения в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у пожилых крыс

Проведенные ранее нами исследования показали, что модель доклинической стадии БП у пожилых крыс воссоздает у животных ранние нарушения сна (гиперсомния, фрагментации сна), которые поддаются коррекции при проведении терапии с препаратом U133 [28]. В многочисленных клинических исследованиях продемонстрирована тесная связь нарушений сна и развития депрессии, позволяющая говорить о наличии общих патофизиологических механизмов этих расстройств. Это позволило нам предположить, что терапия с индуктором шаперонов U133 может корректировать не только нарушения сна, но и признаки депрессивно-подобного поведения, характерные для модели доклинической стадии БП у пожилых животных. Проведенное исследование показало, что у животных в модели доклинической стадии БП на 21-й день после первого введения ЛЦ отмечается снижение предпочтения сладкого раствора сахарозы по сравнению с контрольными животными (рис. 2a). Более того, когда учитывалось общее потребление сахарозы, было выяснено, что модельные животные имели пониженное потребление сахарозы, судя по снижению объема выпитого подслащенного раствора (рис. 2b). При этом разницы в объеме потребляемой воды не наблюдалось по сравнению с контролем (рис. 2c). В совокупности полученные данные указывают на наличие у крыс в модели доклинической стадии БП ключевого депрессивного симптома ангедонии. Терапия с U133 устраняла гедонистический дефицит и животные предпочитали пить подслащенную воду так же охотно, как и нормальные крысы в контрольной группе, при этом возрастало количество потребляемой сахарозы при неизменном количестве потребляемой воды по сравнению с группой животных в модели БП, не получавших терапию (рис. 2).

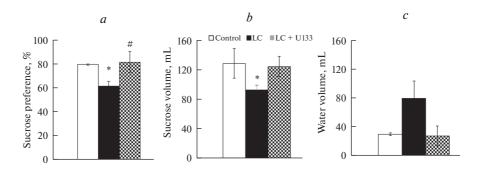


Рис. 2. Изменения в предпочтении раствора сахарозы (*a*), потреблении количества сахарозы (*b*) и воды (*c*) у крыс пожилого возраста в модели доклинической стадии болезни Паркинсона при проведении терапии с U133.

Соntrol — введение контрольного раствора, LC — модель болезни Паркинсона, LC + U133 — терапия с U133 в модели болезни Паркинсона. Применен непараметрический критерий Краскела—Уоллиса; в качестве post-hoc критерия — ранговый критерий Ньюмана—Кейлса. Значения достоверны в опыте относительно контроля * -p < 0.05; LC + U133 по сравнению с LC # -p < 0.05; ## -p < 0.01.

Терапия с U133 препятствует развитию нейродегенерации и ослабляет признаки нейровоспаления в моноаминергических эмоциогенных структурах головного мозга в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у пожилых крыс

При проведении патоморфологического анализа, выполненного после окончания теста на предпочтение сахарозы, выяснено, что развитие признаков депрессивно-подобного поведения в модели доклинической стадии БП у пожилых крыс сопряжено с развитием нейродегенеративного и нейровоспалительного процессов в эмоциогенных структурах головного мозга. Количество ТГ-иммунопозитивных нейронов было уменьшено на 15% (p < 0.05) в ВО покрышки среднего мозга и на 30% (p < 0.01) в голубом пятне. Развитие процесса нейродегенерации в ВО покрышки сопровождалось уменьшением на 17% (p < 0.01) количества ДА-ергических аксонов в вентральном стриатуме, играющем ключевую роль в механизмах формирования удовольствия и вознаграждения у грызунов и человека [14]. Курсовое введение U133 препятствовало развитию нейродегенеративного процесса в эмоциогенных структурах головного мозга при моделировании у животных доклинической стадии БП (рис. 3).

Для того, чтобы оценить влияние индуктора шаперонов U133 на компенсаторные процессы, направленные на поддержание уровня дофамина в мезолимбической системе, был проведен анализ содержания ТГ в нейронах ВО покрышки среднего мозга. У животных в модели доклинической стадии БП в ДА-ергических нейронах ВО покрышки верифицировано увеличение содержания ТГ на 38% (p < 0.05) по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о компенсаторном повышении скорости синтеза дофамина в выживших нейронах. Проведение терапии с U133 не препятствовало развитию компенсаторных реакций, направленных на поддержание уровня дофамина в ВО покрышки у модельных животных; уровень ТГ в ВО оставался повышенным, как и у модельных животных, не получавших терапию с U133 (рис. 4).

Характерным признаком БП является развитие хронического нейровоспаления (т.е. реактивный микроглиоз и инфильтрация лимфоцитов) в нигростриатной и экстранигральных структурах головного мозга, которое провоцируют олигомеры

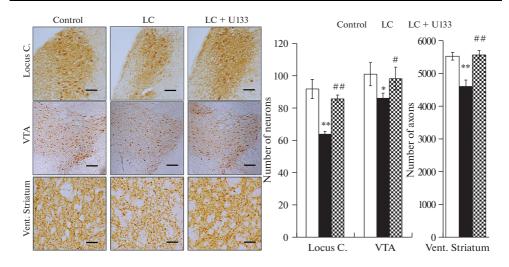


Рис. 3. Влияние терапии с U133 на процесс нейродегенерации в вентральной области покрышки (VTA) среднего мозга, вентральном стриатуме (Vent. Striatum) и голубом пятне (Locus C.) в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у пожилых крыс. Световая микроскопия: ТГ-иммунореактивные нейроны (VTA, Locus C.) и аксоны (Vent. Striatum). Масштаб: 100 мкм — VTA, Locuc C., 200 мкм — Vent. Striatum. На графике по вертикали — количество ТГ-иммунореактивных нейронов и аксонов.

Control — введение контрольного раствора, LC — модель доклинической стадии болезни Паркинсона, LC + U133 — проведение терапии с U133 в модели.

Здесь и на рис. 4 и 5 проведен дисперсионный анализ ANOVA с последующим post-hoc анализом с помощью критерия Тьюки HSD. Значения достоверны в опыте относительно контроля * -p < 0.05; ** -p < 0.01; LC + U133 по сравнению с LC # -p < 0.05; ## -p < 0.01.

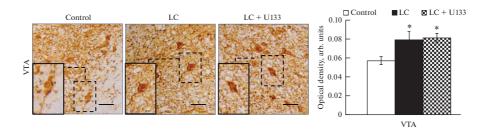


Рис. 4. Влияние терапии с U133 на содержание тирозингидроксилазы в нейронах вентральной области (VTA) покрышки среднего мозга у пожилых крыс в модели доклинической стадии болезни Паркинсона. Световая микроскопия: ТГ-иммунореактивные нейроны в VTA (масштаб 25 мкм). На графике по вертикали — оптическая плотность, условные единицы.

Control — введение контрольного раствора, LC — модель доклинической стадии болезни Паркинсона, LC + U133 — терапия с U133 в модели.

 α -синуклеина, высвобождающиеся во внеклеточное пространство из пораженных нейронов [18]. В нашей работе выяснено, что в ЛЦ-индуцированной модели доклинической стадии БП у пожилых крыс увеличивается количество активированных микроглиоцитов в ВО покрышки на 59% (p < 0.05) и на 43% (p < 0.05) в голубом пятне по сравнению с контролем, что указывает на развитие реактивного мик-

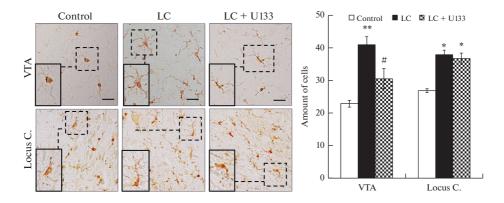


Рис. 5. Изменение числа активированных микроглиоцитов в вентральной области покрышки (VTA) среднего мозга и голубом пятне (Locus C.) при проведении терапии с U133 в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у пожилых крыс. Световая микроскопия: Iba1-иммунореактивные микроглиоциты в VTA и Locus C. Масштаб: 50 мкм. На графике по вертикали — количество Iba1-иммунореактивных микроглиоцитов.

Control — введение контрольного раствора, LC — модель доклинической стадии болезни Паркинсона, LC + U133 — проведение терапии с U133 в модели.

роглиоза. Применение терапии с U133 предотвращало развитие микроглиоза ВО покрышки и не оказывало заметного влияния на микроглиз в голубом пятне (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Спорадической формой БП страдают преимущественно пожилые люди (старше 65 лет). Разработка новой стратегии нейропротективной фармакотерапии БП этой возрастной категории — одна из самых сложных задач. Это обусловлено возрастными изменениями в нейрохимической композиции нейронов центральной и периферической нервной системы, симпатической иннервации периферических органов, сложностями, связанными с повышенной чувствительностью к лекарственным препаратам и развитием побочных эффектов при терапии [2, 33—35]. Кроме того, молекулярно-генетические изменения в стареющем мозге (снижение уровня и активности транскрипционного фактора HSF1, скорости транскрипции генов hsp70 и синтеза ATФ-зависимых шаперонов) снижают надежность регуляции клеточного протеостаза [2, 36, 37]. Поэтому при испытаниях новых терапевтических соединений и фармпрепаратов возрастные изменения должны учитываться при переносе результатов доклинических исследований на стареющего человека.

Недавно в лаборатории создана модель доклинической стадии БП у пожилых крыс [21—25], которая по своим патоморфологическим и нейрохимические признакам соответствует основным требованиям, предъявляемым к животным моделям. Создание такой модели обеспечило проведение мониторинга функционального состояния головного мозга, позволяющего выявить ранние нарушения сна и повышенный уровень тревожности.

Проведенное исследование показало, что у пожилых животных в модели доклинической стадии БП развиваются признаки депрессивно-подобного поведения в виде симптома ангедонии, о чем свидетельствует снижение желания у крыс получать удовольствие от подслащенной сахарозой воды по сравнению с контрольной группой, которые предпочитали пить подслащенную воду. Об этом указывает и пониженное потребление животными сахарозы при неизменной разнице в объеме

потребляемой воды по сравнению с контрольной группой. Патоморфологический анализ эмоциогенных структур головного мозга на модели доклинической стадии БП позволил нам предположить, что патофизиологической основой симптома ангедонии является развитие нейродегенеративного и нейровоспалительного процессов в ДА-ергической системе ВО покрышки среднего мозга и НА-ергической системе голубого пятна, которые включены в механизмы формирования эмоционального поведения у грызунов и человека [15, 38]. Подтверждением этого может быть доказанная эффективность агониста дофаминовых рецепторов прамипексола и противовоспалительных препаратов (целекоксиб, миноциклин) не только и не столько в лечении депрессии в целом, сколько в устранении именно ангедонии различного генеза, в том числе и при БП [39, 40]. Выявленный в нашем исследовании симптом ангедонии может рассматриваться как ранний немоторный маркер БП у пожилых лиц, сигнализирующий о начавшейся дисфункции моноаминергических восходящих систем головного мозга.

Ранее нами показано, что системное введение U133 (5 мг/кг) крысам среднего возраста приводит через 1 сут к значимому возрастанию уровня Hsp70 в черной субстанции и стриатуме вследствие активации транскрипционного фактора HSF1 [27]. При введении такой же дозы U133 пожилым животным Hsp70-индуцирующий эффект соединения был отставлен во времени и максимальный прирост Hsp70 в BO покрышки среднего мозга и голубом пятне наблюдался лишь к 7 суткам. Повышенный уровень Hsp70 сохранялся в течение 3-х последующих дней, что является подходящим для длительного применения этого индуктора с целью терапии. Причиной запаздывания синтеза Hsp70 может быть возрастное снижение скорости транскрипции индуцибельных генов белка теплового шока Hsp70 в головном мозге вследствие снижения уровня и активности HSF1, запускающего экспрессию гена hsp 70. Ранее сообщалось, что возраст влияет на индуцируемую, но не базальную экспрессию генов белков теплового шока HSP70; выяснено, что скорость транскрипции hsp 70 снижается почти на 60% в стареющих фибробластах человека [41] и на 66% в старых Т-лимфоцитах в сравнении с молодыми при действии теплового шока [36]. При этом отмечалось снижение уровня HSF1.

Проведенное исследование показало, что курсовое введение U133 препятствовало проявлению признаков ангедонии и сниженному потреблению сахарозы у пожилых крыс в модели доклинической стадии БП. Эти данные демонстрируют, что индуктор шаперонов U133 оказывает действие, подобное антидепрессанту. Антидепрессантный эффект индуктора белков теплового шока геранилгеранилацетона (тепренона) выявлен и другими исследователями в модели депрессии v мышей. вызванной стрессом социального поражения [42]. Коррекция депрессивно-подобного поведения с помощью Нѕр70-индуцирующей терапии в модели доклинической стадии БП связана в первую очередь с нейропротективными свойствами шаперона Hsp70, которые эффективно проявляются в мезолимбической системе вознаграждения и НА-ергической системе голубого пятна. Об этом свидетельствует значительное уменьшение количества погибших нейронов и ослабление признаков хронического нейровоспаления, судя по уменьшению количества активированной микроглии, в этих эмоциогенных структурах. Запускаемый индуктором шаперонов U133 специализированный мультифакторный механизм мощной нейропротекции не препятствует развитию компенсаторных реакций, направленных на поддержание уровня дофамина в мезолимбической системе (судя по повышенному уровню ТГ в нейронах ВО покрышки) и способствует восстановлению функции восходящих моноаминергических путей. Мы недавно показали, что в основе этого механизма лежит способность Hsp70 напрямую взаимодействовать с агрегатами α-синуклеина и разбирать их, а также снижать содержание патогенной фосфорилированной (Ser129) формы α-синуклеина [24, 27]. Другими исследователями обнаружено, что Hsp70 ингибирует образование фибрилл α-синуклеина за счет избирательного связывания с префибриллами (олигомерами), что приводит к ослаблению их токсических свойств [43]. Кроме того, не менее важным механизмом нейропротекции Hsp70-индуцирующей терапии в нашей модели доклинической стадии БП может быть ее корректирующее влияние на нарушение сна, которое приводит к увеличению пропорции глубокого сна, во время которого повышается скорость синтеза белков и работа глимфатической системы головного мозга [28]. Этот физиологический механизм обеспечивает интенсификацию восстановительных процессов в нервных клетках и очистку мозга от амилоидных белков, что противодействует начавшейся нейродегенерации и дисфункции нервных сетей, вовлеченных в регуляцию интегративных функций мозга. Кроме того, дополнительный вклад в нейропротекцию вносят противовоспалительные свойства Hsp70, которые связаны с его модулирующим влиянием на TLR-2 (Toll-like receptor type-2), воспалительный сигналинг и систему белков транскрипционного фактора NF-кВ [44, 45].

Таким образом, полученные данные демонстрирует, что проведение превентивной фармакотерапии с помощью индуктора шаперонов U133 на модели доклинической стадии БП у пожилых животных оказывает действие, подобное антидепрессантам, которое может быть опосредовано улучшением функционального состояния моноаминергических эмоциогенных структур головного мозга и ослаблением нейровоспаления. Полученные данные являются фундаментальным обоснованием для разработки новой молекулярной технологии превентивной терапии БП и ангедонии различного генеза на основе индукторов шаперонов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118012290427-7).

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование работы (И.В.Е.), проведение экспериментов на животных и сбор данных (М.Б.П., Д.В.Б.), синтез соединения U133 (СГП), анализ данных (И.В.Е., М.Б.П), подготовка (М.Б.П) и написание рукописи (И.В.Е.), просмотр и редактирование (Ю.Ф.П.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE (2017) Parkinson disease. Nat Rev Dis Primers 3: 17013. https://doi.org/10.1038/nrdp
- Chesnokova AY, Ekimova IV, Pastukhov YF (2019) Parkinson's Disease and Aging. Adv Gerontol 9: 164–173. https://doi.org/10.1134/S2079057019020085
- 3. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. Neurology 68(5): 384–386. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03
- Пастухов ЮФ (2013) Изменения характеристик парадоксального сна ранний признак болезни Паркинсона. Журн высш нервн деятельности им ИП Павлова 63(1): 75 [Pastukhov IuF (2013) Changes in the characteristics of paradoxical sleep are an early feature of Parkison's disease. Zhurn Vyssh Nervn Deiatelnosti im IP Pavlova 63(1): 75–85 (In Russ)]. https://doi.org/10.7868/s0044467713010103
- 5. *Stefani A, Högl B* (2020) Sleep in Parkinson's disease. Neuropsychopharmacology 45(1): 121–128. https://doi.org/10.1038/s41386-019-0448-y

- 6. Schrag A, Taddei RN (2017) Depression and Anxiety in Parkinson's Disease. Int Rev Neurobiol 133: 623–655.

 https://doi.org/10.1016/bs.irp.2017.05.024
 - https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.05.024
- 7. Shen CC, Tsai SJ, Perng CL, Kuo BI, Yang AC (2013) Risk of Parkinson disease after depression: a nationwide population-based study. Neurology 81(17): 1538–1544. https://doi.org/0.1212/WNL.0b013e3182a956ad
- 8. Szatmari S, Illigens B.M. W, Siepmann T, Pinter A, Takats A, Bereczki D (2017) Neuropsychiatric symptoms in untreated Parkinson's disease. Neuropsychiatr Disease and Treatment 13: 815–826. https://doi.org/10.2147/NDT.S130997
- 9. *Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K* (2004) Stages in the development of Parkinson's disease related pathology. Cell Tissue Res 318: 121–134. https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9
- Cummings JL (1992) Depression and Parkinson's disease: a review. Am J Psychiatry 149 (4): 443–454. https://doi.org/10.1176/ajp.149.4.443
- 11. *Dunlop BW*, *Nemeroff CB* (2007) The Role of Dopamine in the Pathophysiology of Depression. Arch Gen Psychiatry 64(3): 327–337. https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.3.327
- Chaika AV, Khusainov DR, Cheretaev IV (2018) Chronic Blockade of D₂ Receptors and Behavior in Low-Depressivity Rats. Neurosci Behav Physiol 48: 564–570. https://doi.org/10.1007/s11055-018-0600-x
- 13. Shen CC, Tsai SJ, Perng CL, Kuo BI, Yang AC (2013) Risk of Parkinson disease after depression: a nationwide population-based study. Neurology 81(17): 1538–1544. https://doi.org/0.1212/WNL.0b013e3182a956ad
- Uhl GR, Hedreen JC, Price DL (1985) Parkinson's disease loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. Neurology 35(8): 1215. https://doi.org/10.1212/WNL.35.8.1215
- 15. Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N, Brooks D (2005) Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. Brain 128: 1314—1322. https://doi.org/10.1093/brain/awh445
- 16. *Politis M, Niccolini F* (2015) Serotonin in Parkinson's disease. Behav Brain Res 277: 136–145. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.037
- 17. *Dick O, Nozdrachev A* (2016) Features of parkinsonian and essential tremor of the human hand. Hum Physiol 42: 271–278. https://doi.org/10.1134/S0362119716030063
- Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH (2018) Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. Neurobiol Dis 109(Pt B): 249–257. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.004
- Calamini B, Morimoto RI (2012) Protein homeostasis as a therapeutic target for diseases of protein conformation. Curr Top Med Chem 12(22): 2623–2640. https://doi.org/10.2174/1568026611212220014
- Ciechanover A, Kwon YT (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. Exp Mol Med 47(3): e147. https://doi.org/10.1038/emm.2014.117
- 21. Екимова ИВ, Газизова АР, Карпенко МН, Плаксина ДВ (2018). Признаки ангедонии и деструктивные изменения в вентральной области покрышки среднего мозга в модели доклинической стадии болезни Паркинсона в эксперименте. Журн неврол психиатрии им СС Корсакова 118(9): 61—67. [Ekimova IV, Gazizova AR, Karpenko MN, Plaksina DV (2018) Signs of anhedonia and destructive changes in the ventral tegmental area of the midbrain in the model of the preclinical Parkinson's disease stage in experiment. Zhurn Nevrol Psikhiatrii im SS Korsakova. 118(9): 61—67 (In Russ)]. https://doi.org/10.17116/inevro201811809161
- 22. Abdurasulova IN, Ekimova IV, Matsulevich AV, Gazizova AR, Klimenko VM, Pastukhov YF (2017) Impairment of non-associative learning in a rat experimental model of preclinical stage of Parkinson's disease. Dokl Biol Sci 476(1): 188–190. https://doi.org/10.1134/S0012496617050039
- 23. Ekimova IV, Simonova VV, Guzeev MA, Lapshina KV, Chernyshev MV, Pastukhov YuF (2016) Changes in sleep characteristics of rat preclinical model of Parkinson's disease based on attenuation of the ubiquitin—proteasome system activity in the brain. J Evol Biochem Phys 52: 463–474 https://doi.org/10.1134/S1234567816060057

- 24. *Plaksina DV, Ekimova IV* (2020) Age-related features of α-synuclein pathology in the brain on modeling the preclinical stage of Parkinson's disease in rats. Neurosci Behav Physiol 50: 109–1114. https://doi.org/10.1007/s11055-019-00875-0
- 25. Екимова ИВ, Гузеев МА, Симонова ВВ, Пастухов ЮФ (2020) Возрастные особенности нарушений сна в моделях доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс. Журн неврол психиатрии им СС Корсакова 120:26—33 [Ekimova IV, Guzeev MA, Simonova VV, Pastukhov YF (2020) Age-related differences in sleep disturbances in rat models of preclinical Parkinson's disease. Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova 120:26—33 (In Russ)]. https://doi.org/10.17116/jnevro202012009226
- Friesen EL, De Snoo ML, Rajendran L, Kalia LV, Kalia SK. (2017) Chaperone-Based Therapies for Disease Modification in Parkinson's Disease. Parkinsons Dis 2017: 5015307. https://doi.org/10.1155/2017/5015307
- 27. Ekimova IV, Plaksina DV, Pastukhov YF, Lapshina KV, Lazarev VF, Mikhaylova ER, Polonik SG, Pani B, Margulis BA, Guzhova IV, Nudler E (2018) New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. Exp Neurol 306: 199–208. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012
- 28. Pastukhov YuF, Simonova VV, Shemyakova TS, Guzeev MA, Polonik SG, Ekimova IV (2020) U-133, a chaperone inducer, eliminates sleep disturbances in a model of the preclinical stage of Parkinson's disease in aged rats. Adv Gerontol 10(3): 254–259. https://doi.org/10.1134/S2079057020030133
- 29. Полоник С, Толкач А, Уварова Н (1994) Гликозилирование эхинохрома и родственных гидроксинафтазаринов ортоэфирным методом. Журн орган химии 30(2) 248—253 [Polonik S, Tolkach A, Uvarova N (1994) Glycosylation of echinochrome and related hydroxynaphthazarines by the orthoester method. Zhurn Organ Himii 30(2): 248—253 (In Russ)].
- 30. Mishchenko NP, Fedoreev SA, Bagirova VL (2003) Histochrome: a new original domestic drug. Pharmaceut Chem J 37: 48–52. https://doi.org/10.1023/A:1023659331010
- 31. *Grønli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sørensen E, Portas CM, Ursin R* (2005) Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. Physiol Behav 84 (4): 571–577. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.02.007
- 32. Paxinos G, Watson C (1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. CA Acad San Diego.
- 33. *Anisimov VN* (2008) Evolution of concepts in gerontology and physiological mechanisms of aging. In: Molekulyarnye i fiziologicheskie mekhanizmy stareniya (Molecular and Physiological Mechanisms of Aging) St Petersburg Nauka vol 1, parts 1–3, 49–95, 269–378 (In Russ).
- 34. Porseva V, Korzina M, Spirichev A, Vishnyakova PA, Aryaeva D.A., Nozdrachev AD, Masliukov PM (2020) Changes in the Immunohistochemical Characteristics of Neurons in a Number of Hypothalamic Nuclei on Aging. Neurosci Behav Physiol 50: 645–649. https://doi.org/10.1007/s11055-020-00947-6
- 35. Emanuilov A, Konovalov V, Masliukov P, Polyakov E, Nozdrachev A (2018) Age-development changes of the sympathetic innervation of the rat stomach. Adv Gerontol 31(6): 937–942. https://doi.org/10.1134/S2079057019020097
- 36. *Jurivich D, Choo M, Welk J, Qiu L, Han K, Zhou X* (2005) Human aging alters the first phase of the molecular response to stress in T-cells. Exp Gerontol 40(12): 948–958. https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.08.003
- Labbadia J, Morimoto R (2015) The biology of proteostasis in aging and disease. Annu Rev Biochem 84: 435–464.
 https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955
- 38. *Nestler E, Carlezon W* (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. Biol Psychiatry 59(12): 1151–1159. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.018
- 39. Lee Y, Subramaniapillai M, Brietzke E, Mansur R, Ho R, Yim S, McIntyre R (2018) Anti-cytokine agents for anhedonia: targeting inflammation and the immune system to treat dimensional disturbances in depression. Ther Adv Psychopharmacol 8(12): 337—348. https://doi.org/10.1177/2045125318791944
- 40. Yokochi M (2007) Mesolimbic and mesocortical pathways in Parkinson disease. Brain Nerve 59(9): 943–951. PMID: 17886476
- 41. Liu A, Lin Z, Choi H, Sorhage F, Li B (1989). Attenuated induction of heat shock gene expression in aging diploid fibroblasts. J Biol Chem 264 (20): 12037–12045. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9088-5 26
- 42. Hashikawa N, Utaka Y, Ogawa T, Tanoue R, Morita Y, Yamamoto S, Yamaguchi S, Kayano M, Zamami Y, Hashikawa-Hobara N (2017) HSP105 prevents depression-like behavior by increas-

- ing hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels in mice. Sci Adv 3(5): e1603014. https://doi.org/10.1126/sciadv.1603014
- 43. Auluck P, Chan H, Trojanowski J, Lee V, Bonini N (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Science (New York) 295(5556): 865–868.
 - https://doi.org/10.1126/science.1067389
- 44. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch J, Bare O, Auron P, Stevenson M, Calderwood S (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J Biol Chem 277(17): 15028–15034. https://doi.org/10.1074/jbc.M200497200
- 45. *Guzhova I, Darieva Z, Melo A, Margulis B* (1997). Major stress protein Hsp70 interacts with NF-kB regulatory complex in human T-lymphoma cells. Cell Stress Chaperones 2(2): 132–139. https://doi.org/10.1379/1466-1268(1997)002<0132:msphiw>2.3.co;2

The Chaperone Inducer U133 Eliminates Anhedonia and Prevents the Development of Neurodegeneration in Monoaminergic Emotionogenic Structures of the Brain in a Model of the Preclinical Stage of Parkinson's Disease in Elderly Rats

I. V. Ekimova^a, *, M. B. Pazi^a, **, S. G. Polonik^b, D. V. Belan^a, S. G. Polonik^b, and Yu. F. Pastukhov^a

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

^b Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of Far East Branch, RAS, Vladivostok, Russia

*e-mail: irina-ekimova@mail.ru

**e-mail: pazi.mari@mail.ru

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder predominantly diagnosed in elderly patients, which at present is considered incurable. To date there are no effective neuroprotectors suitable for treatment of PD patients. We have previously demonstrated that therapy with U133, which induces synthesis of heat shock proteins Hsp70 and HSP40 in the brain, prevents the development of neurodegeneration in the nigrostriatal system and eliminates sleep disorders in an animal model of PD. In this study, we evaluated antidepressant properties of preventive therapy with U133, as well as its neuroprotective effect on monoaminergic emotionogenic structures of the brain in a model of preclinical stage of PD in aged Wistar rats (20 months). The model was created by intranasal administration of proteasome inhibitor lactacystin. The study showed that intraperitoneal administration of U133 in aged animals lead to a delayed (after 3-7 days) increase in the level of Hsp70 (HSPA1) in the ventral tegmental area and the locus coeruleus. Preventive therapy with U133 eliminated signs of depression-like behavior in the form of anhedonia, which emerges during preclinical stage of PD in aging rats. It was established that the antidepressant-like effect of the U133 chaperone inducer is due to ability of Hsp70 chaperone to attenuate the processes of neurodegeneration and neuroinflammation in the dopaminergic mesolimbic reward system and the noradrenergic system of the locus coeruleus. The obtained data may be used as a fundamental basis for the development of a new chaperone inducer-based molecular technology of preventive therapy of PD and anhedonia of various origins.

Keywords: Parkinson's disease, lactacystin, compound U133, anhedonia, neurodegeneration, neuroinflammation, ventral tegmental area, locus coeruleus, aging rats

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ==

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОПЕПТИД-Y-ЕРГИЧЕСКИХ ЭНТЕРАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ ПОДСЛИЗИСТОГО СПЛЕТЕНИЯ ТОНКОЙ КИШКИ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2021 г. П. М. Маслюков^{1, *}, А. Ф. Будник², П. А. Вишнякова¹, А. В. Павлов¹

¹Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

²Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова,

Йальчик, Россия

*E-mail: mpm@ysmu.ru

Поступила в редакцию 08.02.2021 г. После доработки 13.03.2021 г. Принята к публикации 14.03.2021 г.

Нейропептид Y (NPY) выполняет разнообразные функции в нервной системе, включая регуляцию сосудистого тонуса и гастроинтестинальной секреции, оказывает прямое тормозящее влияние на моторику и секрецию кишечника. Колокализация NPY с ферментом синтеза ацетилхолина — холинацетилтрансферазой (ChAT), нейрональной NO-синтазой (nNOS), вазоактивным интестинальным пептидом (VIP) и кальций-связывающим белком кальбиндином (СВ) выявлялась в нейронах подслизистого сплетения тонкой кишки крыс разного возраста (от момента рождения до наступления старости) при помощи иммуногистохимического метода двойного мечения антителами и флуоресцентной микроскопии. С момента рождения все NPY-иммунореактивные нейроны колокализуют СhAT. Большая часть NPY-содержащих нейронов также содержит VIP и СВ. У старых крыс процент NPY-иммунореактивных нейронов, содержащих CB, VIP и ChAT, снижается. У юных крыс, от новорожденных до 20 суток жизни, а также у старых животных в NPY-позитивных нейронах выявляется nNOS. Таким образом, на ранних этапах онтогенеза и у старых крыс энтеральные NPY-иммунореактивные нейроны подслизистого сплетения метасимпатической нервной системы содержат более широкий спектр нейротрансмиттеров по сравнению с взрослыми животными.

Ключевые слова: нейропептид Y, метасимпатическая нервная система, иммуногистохимия, интрамуральные ганглии, онтогенез

DOI: 10.31857/S0869813921100083

Нейрохимический состав ганглиев метасимпатической нервной системы отличается значительной вариацией. Медиатор ацетилхолин, синтезируемый ферментом холинацетилтрансферазой (ChAT) содержится в большей части ганглионарных нейронов. Кроме ацетилхолина, нейроны интрамуральных ганглиев могут содержать другие нейротрансмиттеры, включая оксид азота (NO), серотонин, гистамин, а также нейропептиды: нейропептид Y (NPY), вазоактивный интестинальный полипептид (VIP) и другие [1-3].

NPY широко распространен в желудочно-кишечном тракте, выявляется в волокнах, направляющихся к слизистой и мышечной оболочке, а также к гладким мышцам сосудов [4–6]. NPY обнаруживается примерно в половине нейронов под-

слизистого нервного сплетения (ПС) и лишь в небольшой части нейронов межмышечного сплетения мыши и крысы [7, 8].

В интрамуральных узлах кишки грызунов большинство NPY-иммунореактивных (ИР) нейронов колокализуют ChAT [7, 9]. Нейроны, колокализующие ChAT, кальций-связывающий белок кальбиндин (СВ), NPY, VIP считаются секретомоторными нейронами [1, 3, 9]. Согласно данным литературы, в периферических нейронах содержится так называемая периферическая изоформа ChAT (pChAT) [10].

NPY оказывает прямое тормозящее влияние на моторику и секрецию кишечника. Кроме этого, NPY способствует нейрогенезу и ангиогенезу [11—13]. Нейроны ПС регулируют транспорт ионов и воды через эпителий кишечника, а также секреторную функцию желез. Секреторные нарушения в виде гипер- или гипосекреции могут быть связаны с нарушением деятельности NPY-ергических нейронов ПС, преимущественно тонкой кишки.

В онтогенезе морфологические характеристики и химический состав нейронов автономной нервной системы изменяется [2, 14, 15]. Это касается изменения размеров нейронов, содержания кальций-связывающих белков, нейропептидов, медиаторов и ферментов их синтеза, в том числе экспрессии NPY и его рецепторов. Установлено, что доля нейронов, содержащих NPY в метасимпатических узлах ПС тонкой кишки увеличивается с момента рождения до 20–30 суток жизни, а затем снижается [8]. Тем не менее, изменения нейрохимического состава нейропептид Y-содержащих метасимпатических энтеральных нейронов остаются малоисследованными.

Целью настоящей работы явилось определение колокализации NPY с ферментами синтеза нейротрансмиттеров и нейротрансмиттерами в нейронах ПС тонкой кишки крыс в постнатальном онтогенезе от момента рождения и до наступления старости животных при помощи иммуногистохимических методов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на новорожденных, 10-, 20-, 30-суточных, 6-месячных, 2-летних крысах линии Вистар (по 5 в каждой возрастной группе). Животные содержались в стандартных условиях вивария в акриловых клетках с деревянной стружкой в акклиматизированном помещении (12/12 ч свет/темнота, при температуре 22 ± 3°С) на полнорационной сбалансированной диете со свободным доступом к пище и воде. Исследование проводилось с соблюдением "Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР), в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями этического комитета ЯГМУ (протокол N 41 от 22.10.2020). После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутрибрюшинно), животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS; 0.01 M, рН 7.4) (БиолоТ, Россия), затем 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии участки двенадцатиперстной кишки длиной по 0.5 см извлекались и помещались в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 1—2 ч. Серии срезов толщиной 12 мкм изготовляли на криостате.

С целью выявления нейронов, содержащих NPY, ChAT, VIP, nNOS и СВ применялось двойное мечение антителами. Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% ослиной сыворотки (Jackson Immunoresearch, США), 1% тритона X-100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина, 0.05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами (табл. 1) в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами в течение 2 ч. Вторичные антитела были конъюгированы с флуорохромами — флуоресцеин-изотиоцианатом

Тип антител	Животное-донор	Разведение	Источник	Кат №
ChAT*	Коза	1:100	Millipore	AB144p
VIP	Кролик	1:300	Abcam	ab43841
nNOS	Коза	1:300	Abcam	ab1376
NPY	Кролик	1:500	Abcam	ab30914
NPY	Овца	1:500	Abcam	ab6173
СВ	Кролик	1:500	Abcam	ab11426

Таблица 1. Использованные первичные антитела

(FITC), дающим зеленую флуоресценцию и индокарбоцианином (Cy3), дающим красную флуоресценцию (разведение 1 : 150, Jackson Immunoresearch, США). После этого срезы снова отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлуоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Отрицательный контроль проводился с заменой первичных антител ослиной сывороткой.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой ССD камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Для определения процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу Image J (NIH, США, http://rsb.info.nih.gov/ij/). Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро с ядрышком. Суммарное количество ИР нейронов, содержащих только красную, только зеленую, и колокализующих обе метки (желтый цвет при наложении изображений) принимали за 100%. Подсчет ИР нейронов проводили в случайно выбранных измеренных областях (площадь изображения составляла 0.12 мм²) при 200-кратном увеличении. Для каждого животного использовали 5 изображений на 5 срезах (по одному изображению на срез).

Математическая обработка данных проведена с использованием пакетов прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, США). Все величины представлены как средняя арифметическая \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекцией Бонферрони. Достоверными считали различия при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ПС NPY-ИР нейроны выявлялись в большом количестве во всех возрастных группах (рис. 1–5). Все NPY-ИР нейроны (100%) с момента рождения до старости содержали фермент синтеза ацетилхолина — ChAT (рис. 1). При этом выявлялась часть ChAT-ИР NPY-негативных клеток, процент которых достоверно увеличивался с 20-е по 30-е сутки, а также у старых крыс (p < 0.05, рис. 2).

С момента рождения большая часть NPY-содержащих нейронов также содержала CB (рис. 3), VIP (рис. 4) и nNOS (рис. 5). Процент NPY-ИР нейронов, колокализующих CB, достоверно возрастал между 10-ми и 20-ми сутками жизни (p < 0.05, рис. 2), оставаясь постоянным до 6 месяцев, и уменьшался у старых крыс (p < 0.01). У старых крыс по сравнению с более молодыми также достоверно увеличивался процент CB-ИР нейронов, не содержащих NPY (p < 0.001).

^{*}Применялись антитела к периферической изоформе ChAT (pChAT).

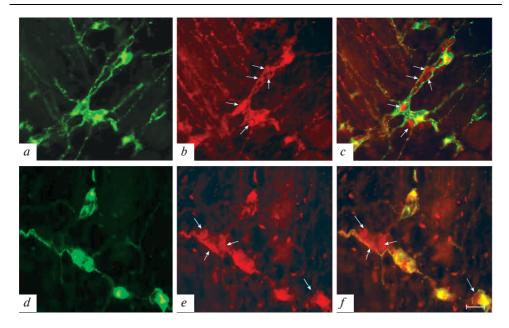


Рис. 1. Микрофотографии нейронов, содержащих NPY (a,d), ChAT (b,e), а также колокализация NPY и ChAT (c,f) в интрамуральных ганглиях ПС двенадцатиперстной кишки 20-суточных (a-c) и двухлетних (d-f) крыс. ChAT(+)/NPY(-) нейроны указаны стрелками. Флуоресценция Су3 (красный, ChAT), FITC (зеленый, NPY). Масштаб — 50 мкм.

Процент NPY-ИР нейронов, колокализующих VIP, достоверно не отличался у юных и взрослых крыс (p > 0.05, рис. 2), но снижался у старых крыс (p < 0.001). У старых животных относительно более молодых достоверно возрастала доля NPY-ИР VIP-негативных нейронов (p < 0.001).

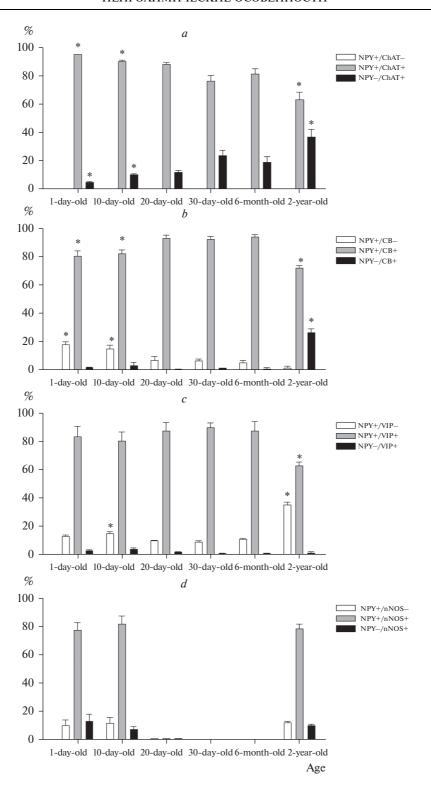
У юных крыс от новорожденных до 20-х суток жизни, а также у старых животных в NPY-позитивных нейронах выявлялась nNOS. Следует отметить, что если у новорожденных и 10-суточных животных выявлялось значительное количество nNOS-ИР нейронов, то у 20-суточных отмечались лишь единичные клетки. Тем не менее, у старых крыс доля nNOS-ИР нейронов опять становится сопоставимой с новорожденными и 10-суточными, без достоверных различий между этими группами (p > 0.05, рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего исследования показывают, что NPY-ИР нейроны выявляются в узлах ΠC в большом количестве с момента рождения. Данные нашего предыдущего исследования свидетельствуют, что процент NPY-ИР нейронов ΠC тонкой кишки непостоянен в онтогенезе, а наибольший процент у крыс наблюдался в возрасте 20-30-ти суток [8].

Рис. 2. Процентное содержание NPY-ИР нейронов, колокализующих ChAT (a), CB (b), VIP (c), nNOS (d) у крыс разного возраста.

^{*}p < 0.05 — различия достоверны по сравнению с 30-суточной крысой.



NPY-ИР и иммунонегативные нейроны относятся к разным функциональным популяциям. ПС у морских свинок и мышей содержит четыре типа нейронов, включая секретомоторные и вазомоторные нейроны, а также собственные первичные афферентные нейроны [1, 3]. Нейроны, колокализующие ChAT, CB, NPY и VIP, считаются секретомоторными нейронами [9].

NPY оказывает прямое тормозящее влияние на моторику и секрецию кишечника. Ингибирующее влияние NPY на секреторную функцию кишки реализуется путем активации Y1-постсинаптических рецепторов энтероцитов и нейрональных пресинаптических Y2-рецепторов [4, 16]. Учитывая, что нейроны ПС участвуют в регуляции секреции, можно предположить, что в возрасте 20—30-ти суток происходит окончательное формирование секреторной функции тонкой кишки, связанное с переходом с молочного питания на самостоятельное. При этом NPY может играть особую роль в становлении функции тонкой кишки, действуя не только в качестве котрансмиттера, но и как трофический фактор. Кроме влияния на тонус сосудов, деятельность сердца, секреторную и моторную функцию желудочно-кишечного тракта, NPY стимулирует нейрогенез, а также оказывает трофические эффекты, в частности способствует ангиогенезу и гипертрофии миокарда [11—13]. В кишке NPY играет также важную роль в модулировании функций иммунных клеток и эпителиального барьера.

Мы впервые исследовали колокализацию NPY и ChAT с момента рождения до наступления старости у крыс. На протяжении постнатального онтогенеза все NPY-ИР нейроны содержит фермент синтеза ацетилхолина — ChAT, что соответствует данным литературы, полученным на взрослых животных [1, 3, 7]. Мы также обнаружили, что NPY-ИР холинергические нейроны в большинстве своем содержат VIP и CB у юных, взрослых и старых крыс.

Интересно, что один и тот же нейрон подслизистого сплетения содержит нейротрансмиттеры, стимулирующие секрецию (VIP) и тормозящие ее (NPY) [1]. Вероятно, выделение VIP или NPY зависит от характера стимуляции. Например, из симпатических терминалей при низкочастотной стимуляции выделяется норадреналин, а при высокочастотной — NPY [5]. Считается, что NPY оказывает провоспалительный эффект, а VIP — противовоспалительный [17]. Повышение процента NPY(+)/VIP(—) и уменьшение доли VIP-ИР нейронов может быть свидетельством того, что старение сопровождается повышением уровня воспалительных процессов во многих тканях, включая нервную систему и желудочно-кишечный тракт [18].

Мы обнаружили, что в раннем возрасте большая часть NPY-ИР нейронов транзиторно экспрессирует nNOS. При этом небольшая часть NPY-негативных нейронов у новорожденных и 10-суточных животных также колокализует nNOS. Тем не менее, nNOS в ПС выявляется лишь у единичных нейронов в возрасте старше 20-ти суток, но опять обнаруживается у старых животных. Согласно литературным данным, лишь 1% нейронов подслизистого сплетения тонкой кишки взрослой мыши содержат nNOS, однако в позднем эмбриональном и раннем постнатальном периоде nNOS обнаруживается в 50% нейронов ПС [19, 20]. Сходным образом холинергические нейроны симпатических узлов экспрессируют ChAT и фермент синтеза катехоламинов — тирозингидроксилазу, которая перестает выявляться с третьей недели жизни [21]. Также транзиторная экспрессия nNOS наблюдается в эмбриональном периоде в спинномозговых узлах, мозжечке, стволе мозга, коре больших полушарий и гиппокампе [22, 23]. Ряд авторов связывает такую транзиторную экспрессию с ролью NO в устранении избыточной синаптической иннервации, наблюдающейся в развивающейся нервной системе, и тонкой настройкой синаптического аппарата, сопровождающегося активацией одних синапсов и элиминацией малоактивных [23, 24]. Также NO увеличивает возбудимость нейронов за счет модуляции активности K⁺-каналов [24]. Увеличение экспрессии nNOS в старости также

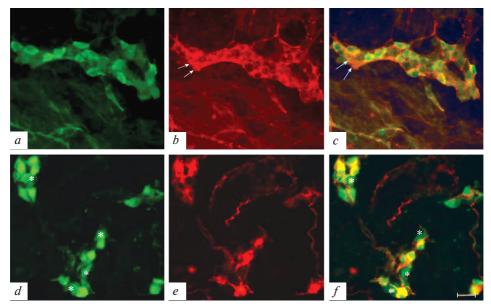


Рис. 3. Микрофотографии нейронов, содержащих СВ (a,d), NPY (b,e), а также колокализация СВ и NPY (c,f) в интрамуральных ганглиях ПС двенадцатиперстной кишки 20-суточных (a-c), и двухлетних (d-f) крыс. СВ(-)/NPY(+) нейроны (b,c) указаны стрелками, СВ(+)/NPY(-) нейроны (d,f) – звездочкой. Флуоресценция СуЗ (красный, NPY), FITC (зеленый, СВ). Масштаб – 50 мкм.

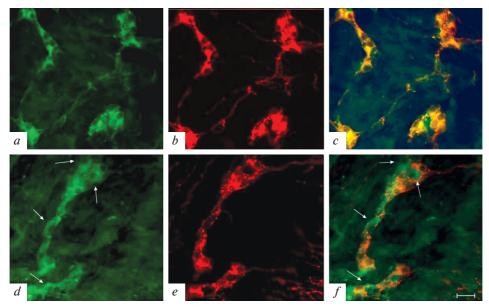


Рис. 4. Микрофотографии нейронов, содержащих NPY (a,d), VIP (b,e), а также колокализация NPY и VIP (c,f) в интрамуральных ганглиях ПС двенадцатиперстной кишки 20-суточных (a-c), и двухлетних (d-f) крыс. NPY(+)/VIP(-) нейроны указаны стрелками. Флуоресценция Су3 (красный, VIP), FITC (зеленый, NPY). Масштаб — 50 мкм.

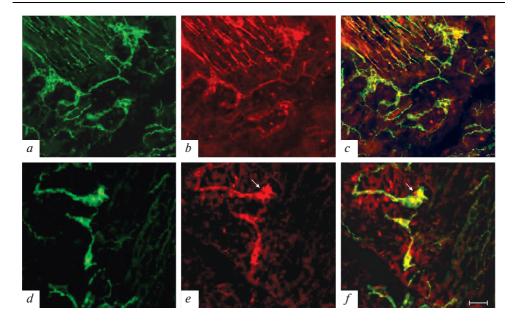


Рис. 5. Микрофотографии нейронов, содержащих NPY (a, d), nNOS (b, e), а также колокализация NPY и nNOS (c, f) в интрамуральных ганглиях ПС двенадцатиперстной кишки 10-суточных (a-c), и двухлетних (d-f) крыс. nNOS(+)/NPY(-) нейрон указан стрелкой. Флуоресценция Су3 (красный, nNOS), FITC (зеленый, NPY). Масштаб – 50 мкм.

отмечается в нейронах ЦНС [25, 26]. Предполагается, что это может, с одной стороны, способствовать апоптозу, с другой — иметь антиапоптотическое значение.

Таким образом, на ранних этапах онтогенеза и в старости энтеральные нейроны метасимпатической нервной системы, в частности содержащие нейропептид Y, содержат более широкий спектр нейротрансмиттеров по сравнению со взрослыми животными. Впервые показано, что NPY-ергические нейроны подслизистого сплетения крыс, наряду с холинацетилтрансферазой, вазоинтестинальным пептидом и кальбиндином, у новорожденных и старых крыс также экспрессируют нейрональную NO-синтазу.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РНФ (грант № 19-15-00039).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента — Π .М.М., A.В.П., сбор данных — A.Ф.Б., Π .А.В., обработка данных — A.Ф.Б., Π .А.В., написание и редактирование статьи — Π .М.М., A.В.П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Furness JB (2006) The enteric nervous system. Oxford: Blackwell Publishing.

- 2. *Masliukov PM, Budnik AF, Nozdrachev AD* (2017) Neurochemical Features of Metasympathetic System Ganglia in the Course of Ontogenesis. Adv Gerontol 7(4): 281–289. https://doi.org/10.1134/S2079057017040087
- 3. Furness JB, Stebbing MJ (2018) The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. Neurogastroenterol Motil 30(2): e13234. https://doi.org/10.1111/nmo.13234
- Cox HM (2007) Neuropeptide Y receptors; antisecretory control of intestinal epithelial function. Auton Neurosci 133(1): 76–85. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.10.005
- 5. Nozdrachev AD, Masliukov PM (2011) Neuropeptide Y and autonomic nervous system. Zh Evol Biokhim Fiziol 47: 105–112. https://doi.org/10.1134/S0022093011020010
- Rytel L, Szymanska K, Gonkowski I, Wojtkiewicz J (2018) Neurochemical characterization of intramural nerve fibres in the porcine oesophagus. Anat Histol Embryol 47(6): 517–526. https://doi.org/10.1111/ahe.12391
- 7. Mongardi Fantaguzzi C, Thacker M, Chiocchetti R, Furness JB (2009) Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. Cell Tissue Res 336(2): 179–189. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0773-2
- 8. Budnik AF, Aryaeva D, Vyshnyakova P, Masliukov PM (2020) Age related changes of neuropeptide Y-ergic system in the rat duodenum. Neuropeptides 80:101982. https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101982
- 9. *Mann PT, Furness JB, Southwell BR* (1999) Choline acetyltransferase immunoreactivity of putative intrinsic primary afferent neurons in the rat ileum. Cell Tissue Res 297: 241–248. https://doi.org/10.1007/s004410051352
- 10. *Колос ЕА*, *Коржевский ДЭ* (2016) Неоднородность реакции на холинацетилтрансферазу в холинергических нейронах. Нейрохимия 33(1): 56–62. [Kolos EA, Korzhevskii DA (2016) Heterogeneous choline acetyltransferase staining in cholinergic neurons. Neurochem J 10(1): 47–52 (In Russ).
- 11. *Jia C, Hegg CC* (2015) Effect of IP3R3 and NPY on age-related declines in olfactory stem cell proliferation. Neurobiol Aging 36(2): 1045–1056. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.007
- 12. Saraf R, Mahmood F, Amir R, Matyal R (2016) Neuropeptide Y is an angiogenic factor in cardiovascular regeneration. Eur J Pharmacol 776: 64–70. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.033
- 13. *Tan CMJ*, *Green P*, *Tapoulal N*, *Lewandowski AJ*, *Leeson P*, *Herring N* (2018) The Role of Neuropeptide Y in Cardiovascular Health and Disease. Front Physiol 9: 1281. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01281
- Foong JP (2016) Postnatal Development of the Mouse Enteric Nervous System. Adv Exp Med Biol 891: 135–143. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27592-5
- 15. Masliukov PM, Moiseev K, Budnik AF, Nozdrachev AD, Timmermans JP (2017) Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats. Cell Mol Neurobiol 37(7):1257–1267. https://doi.org/10.1007/s10571-016-0457-x
- 16. Tough IR, Forbes S, Tolhurst R, Ellis M, Herzog H, Bornstein JC, Cox HM (2011) Endogenous peptide YY and neuropeptide Y inhibit colonic ion transport, contractility and transit differentially via Y1 and Y2 receptors. Br J Pharmacol 164: 471–484. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01401.x
- Chandrasekharan B, Nezami BG, Srinivasan S (2013) Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304(11): G949–G957. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00493.2012
- 18. Wyss-Coray T (2016) Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. Nature 539(7628): 180–186. https://doi.org/10.1038/nature20411
- 19. *Young HM, Ciampoli D* (1998) Transient expression of neuronal nitric oxide synthase by neurons of the submucous plexus of the mouse small intestine. Cell Tissue Res 291: 395–401. https://doi.org/10.1007/s004410051009
- Bergner AJ, Stamp LA, Gonsalvez DG, Allison MB, Olson DP, Myers MGJr, Anderson CR, Young HM (2014) Birthdating of myenteric neuron subtypes in the small intestine of the mouse. J Comp Neurol 522(3): 514–527. https://doi.org/10.1002/cne.23423
- 21. Maslyukov PM, Shilkin VV, Timmermans JP (2006) Immunocytochemical characteristics of neurons in the stellate ganglion of the sympathetic trunk in mice during postnatal ontogenesis. Neurosci Behav Physiol 36(8): 851–855. https://doi.org/10.1007/s11055-006-0097-6

- Bredt DS, Snyder SH (1994) Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. Neuron 13: 301–313. https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90348-4
- 23. Portillo F, Moreno-López B (2020) Nitric oxide controls excitatory/inhibitory balance in the hypoglossal nucleus during early postnatal development. Brain Struct Funct 225(9): 2871–2884. https://doi.org/10.1007/s00429-020-02165-9
- 24. *González-Forero D, Moreno-López B* (2014) Retrograde response in axotomized motoneurons: nitric oxide as a key player in triggering reversion toward a dedifferentiated phenotype. Neuroscience 283: 138–165. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.021
- Dawson TM, Dawson VL (2018) Nitric oxide signaling in neurodegeneration and cell death. Adv Pharmacol 82: 57–83. https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.09.003
- 26. Moiseev KY, Vishnyakova PA, Porseva VV, Masliukov AP, Spirichev AA, Emanuilov AI, Masliukov PM (2020) Changes of nNOS expression in the tuberal hypothalamic nuclei during ageing. Nitric Oxide 100-101: 1–6. https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.04.002

Neurochemical Features of the Neuropeptide Y-Ergic Enteric Submucous Neurons of the Small Intestine in Postnatal Ontogenesis

P. M. Masliukov^{a, *}, A. F. Budnik^b, P. A. Vishnyakova^a, and A. V. Pavlov^a

^a Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia
 ^b Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Russia
 *e-mail: mpm@ysmu.ru

Neuropeptide Y (NPY) plays an important role in the nervous system, including the regulation of vascular tone and gastrointestinal secretion, has a direct inhibitory effect on intestinal motility and secretion. Colocalization of NPY with the enzyme for the synthesis of acetylcholine — choline acetyltransferase (ChAT), neuronal NO synthase (nNOS), vasoactive intestinal peptide (VIP) and calcium-binding protein calbindin (CB) was detected in the neurons of the submucous plexus of the small intestine of rats from the moment of birth until old age using immunohistochemical method of double labeling with antibodies and fluorescence microscopy. From the moment of birth, all NPY-immunoreactive neurons colocalize ChAT. Most of NPY-containing neurons also contain VIP and CB. In aged rats, the percentage of NPY-immunoreactive neurons containing CB, VIP, and ChAT decreases. In young rats from newborns to 20-day-old as well as in aged rats, nNOS is detected in NPY-positive neurons. Thus, at the early stages of ontogenesis and in the senescence, the enteric metasympathetic NPY-immunoreactive submucous neurons contain a wider range of neurotransmitters when compared to adult animals.

Keywords: neuropeptide Y, metasympathetic nervous system, immunohistochemistry, intramural ganglia, ontogenesis

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

АМИГДАЛОФУГАЛЬНАЯ МОДУЛЯЦИЯ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ НОЦИЦЕПТИВНОЙ ТРАНСМИССИИ В КАУДАЛЬНОЙ ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОЙ РЕТИКУЛЯРНОЙ ОБЛАСТИ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ КИШЕЧНОМ ВОСПАЛЕНИИ

© 2021 г. О. А. Любашина^{1, *}, И. Б. Сиваченко¹, И. И. Бусыгина¹

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

> Поступила в редакцию 24.02.2021 г. После доработки 25.03.2021 г. Принята к публикации 26.03.2021 г.

Амигдала - одна из ключевых лимбических структур головного мозга, обеспечивающих центральную регуляцию функций автономной нервной системы. Центральному ядру амигдалы (ЦеА) отводят ведущую роль в эмоционально-аффективной оценке и модуляции поступающей в мозг висцеросенсорной информации, в том числе ноцицептивных сигналов от желудочно-кишечного тракта. Недавно полученные данные о нейропластических перестройках в ЦеА при воспалении толстой кишки указывают на возможность влияния периферической патологии на процессы амигдалярного контроля висцеральных болевых сигналов. Однако конкретные механизмы реализации этих процессов и изменения в них при органических заболеваниях остаются малоизученными, сдерживая разработку эффективных методов лечения абдоминальных болевых синдромов. Целью наших нейрофизиологических экспериментов на анестезированных крысах являлось определение нейрональных механизмов, обеспечивающих амигдалофугальную модуляцию висцеральной ноцицептивной трансмиссии на уровне продолговатого мозга, с оценкой особенностей их реализации при кишечном воспалении. Для этого у здоровых животных и крыс с экспериментальным колитом изучали эффекты электрической стимуляции ЦеА на импульсную активность нейронов бульбарной каудальной вентролатеральной ретикулярной области (кВЛРО), вызванную ноцицептивным колоректальным растяжением (КРР). Установлено, что ЦеА оказывает подавляющее действие на нейрональные процессы обработки кВЛРО ноцицептивных сигналов от толстой кишки, которое проявляется в уменьшении возбуждающих и ослаблении тормозных реакций бульбарных нейронов на КРР. Такой эффект может способствовать уменьшению восходящего болевого потока и инициируемых им рефлекторных реакций бульбарного уровня, т.е. является антиноцицептивным. Впервые показано, что колит сопровождается ослаблением угнетающих влияний ЦеА на возбуждающиеся в ответ на КРР клетки кВЛРО при сохранении амигдалофугального подавления тормозных ноцицептивных нейрональных реакций. Выявленные изменения могут приводить к усилению супраспинальной трансмиссии болевых сигналов от кишки, т.е. лежать в основе центральных механизмов патогенеза кишечной гипералгезии и хронической абдоминальной боли.

Ключевые слова: центральное ядро амигдалы, каудальная вентролатеральная ретикулярная область, кишечная ноцицепция, нейрональная активность, колит

DOI: 10.31857/S086981392110006X

Амигдала является одной из ключевых лимбических структур головного мозга, обеспечивающих центральную регуляцию функций автономной нервной системы [1, 2]. Реципрокные связи амигдалы со стволовыми структурами, а также с интегративными субкортикальными и кортикальными областями [1, 3] позволяют ей взаимодействовать с автономными центрами мозга и координировать их активность в целях формирования адекватных текущему мотивационно-эмоциональному состоянию висцеральных и эндокринных ответов [1, 2]. В этом контексте важными функциями амигдалы являются эмоционально-аффективная оценка и модуляция поступающей в мозг висцеросенсорной информации, в том числе ноцицептивных сигналов, исходящих от органов желудочно-кишечного тракта [4—6].

Участие амигдалы в контроле абдоминальной ноцицепции продемонстрировано клиническими и экспериментальными исследованиями. С помощью методов нейровизуализации мозга человека показано, что механическое растяжение прямой кишки вызывает активацию этой переднемозговой структуры [7, 8]. Усиление нейрональной активности центрального ядра амигдалы (ЦеА) после химического или механического кишечного раздражения было отмечено в экспериментах на крысах [9, 10]. Также на грызунах было установлено, что фармакологическая модуляция активности ЦеА оказывает влияние на висцеральную чувствительность. Так, микроинъекции в это ядро кортикостерона, кортикотропин-рилизинг-фактора, модуляторов его рецепторов 1 типа, глюкокортикоидных или глутаматных рецепторов способствовали усилению [6, 11–13], либо ослаблению реакции бодрствующего животного на колоректальное растяжение [12, 14, 15]. Эти данные подтверждают важную роль амигдалы и, прежде всего, ее центрального ядра в супраспинальной модуляции кишечной ноцицепции. Между тем, обеспечивающие эту функцию ЦеА нейрональные механизмы до сих пор остаются неясными.

Кроме того, в последние годы установлено, что патология желудочно-кишечного тракта сопровождается существенными структурными, молекулярными и функциональными перестройками в амигдале и ее центральном ядре. В частности, у пациентов с воспалительными заболеваниями толстой кишки обнаружены изменения объема серого вещества, количества нейрокининовых рецепторов в амигдале [16–18] и ее неадекватная активация при стрессорных воздействиях [8, 19]. В свою очередь, в экспериментальных исследованиях на моделях колита у крыс и мышей в ЦеА наблюдалось увеличение базальной и вызванной нейрональной активности, усиление синаптической передачи [20-22], повышенная экспрессия кортикотропинрилизинг-фактора и активность метаботропных глутаматергических рецепторов I группы, сниженные экспрессии рецептора кортикостерона и нейропептида Y [21, 23, 24]. Эти вызванные периферическим воспалением перестройки могут изменять процессы обработки амигдалой интероцептивных сигналов и ее модулирующие влияния на висцеросенсорную активность автономных центров мозга, способствуя усилению абдоминальной ноцицепции и ощущения боли. Однако как сами механизмы реализации этих процессов, так и возможные изменения в них при кишечной патологии остаются неизученными. Это существенно сдерживает разработку эффективных методов лечения абдоминальных болевых синдромов, особенно их хронических форм, в патогенезе которых ведущую роль отводят нарушениям в супраспинальных механизмах контроля ноцицептивной информации от толстой кишки [25, 26].

Поэтому целью проведенных нами нейрофизиологических экспериментов на крысах являлось выяснение нейрональных механизмов, обеспечивающих амигдалофугальную модуляцию висцеральной ноцицептивной трансмиссии на уровне продолговатого мозга, с оценкой особенностей их реализации при кишечном воспалении. Для этого у здоровых животных и крыс с экспериментальным колитом мы изучали эффекты электрической стимуляции ЦеА на вызванную ноцицептив-

ным колоректальным растяжением импульсную активность нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области (кВЛРО) продолговатого мозга — первого супраспинального автономного центра, получающего ноцицептивную информацию от толстой кишки по волокнам спинальной вентролатеральной системы [2, 27, 28].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 27 взрослых самцах крыс линии Вистар (масса тела 280—360 г) из Коллекции лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все экспериментальные процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Животных после 24-часовой пищевой депривации анестезировали внутрибрюшинным введением смеси уретана (800 мг/кг; Sigma-Aldrich, США) и альфа-хлоралозы (60 мг/кг; ICN Biomedicals, США). В бедренные артерию и вену устанавливали катетеры для регистрации артериального давления с помощью полупроводникового датчика MLT0670 (ADInstruments, Великобритания) и для внутривенного введения анестетика в случае необходимости. После трахеостомии (для облегчения процесса дыхания в условиях эксперимента) голову крысы закрепляли в стереотаксическом приборе (Медикор, Венгрия) под углом 30° к горизонтальной плоскости. Посредством рассечения мягких тканей обеспечивали доступ к затылочной кости черепа, нижнюю часть которой удаляли вместе с подлежащей твердой мозговой оболочкой. Открытую дорсальную поверхность продолговатого мозга заливали теплым физиологическим раствором. Для доступа к центральному ядру амигдалы просверливали миллиметровое отверстие в зоне его проекции на левую теменную кость согласно стандартному атласу мозга крысы [29]. В отверстие погружали монополярный вольфрамовый стимулирующий электрод в лаковой изоляции с кончиком диметром 5 мкм и сопротивлением 50 кОм (Science Products GMBH, Германия), который размещали в пределах стереотаксических координат латеральной части ядра (2.1-2.6 мм каудальнее брегмы, 4.0-4.5 мм латеральнее средней линии, 6.5-7.6 мм от поверхности мозга), непосредственно связанной с процессами контроля ноцицепции [30, 31]. Индифферентный электрод закрепляли в контралатеральной височной мышце.

Для ноцицептивного колоректального растяжения использовали интраректально введенный резиновый баллон длиной 7 см, который раздували воздухом до давления 80 мм рт. ст. с помощью автоматического шприцевого насоса (ДШ-09, Висма-Планар, Беларусь). Индикатором ноцицептивного характера применяемой стимуляции на системном уровне служили вызываемые ею колебания уровня артериального давления. Внеклеточную регистрацию вызванной кишечной стимуляцией активности нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга осуществляли вольфрамовыми микроэлектродами (кончик 1 мкм, сопротивление 1 МОм; World Precision Instruments, США). При поиске нейронов микроэлектрод перемещали в зоне, расположенной на 1.0-1.4 мм ростральнее задвижки и 1.9-2.3 мм латеральнее средней линии на глубине 2.8-3.4 мм от поверхности мозга, с помощью электронного погружающего устройства (МП-2, Россия) с шагом 4 мкм. Отводимый сигнал после усиления и фильтрации в диапазоне 400— 5000 Гц (усилитель DAM 80, World Precision Instruments, США) поступал на вход звуковой карты компьютера. Визуализацию и запись нейрональной активности в режиме реального времени осуществляли посредством программы Audition 3 (Adobe Corp, США). Запись производили на трехминутном интервале − 1 мин до стимуляции (фоновый показатель), 1 мин во время колоректального растяжения и 1 мин после него. Последующий анализ с селекцией нейрональных разрядов по форме выполняли с помощью программы Spike 2 (CED, Великобритания). Для разных импульсных потоков определяли среднюю частоту разрядов на последовательных минутных интервалах, указанных выше. Нейроны считали реагирующими на ноцицептивную стимуляцию, если частота их разрядов во время раздражения изменялась по отношению к фоновому значению не менее чем на 15%.

Для каждого регистрируемого нейрона оценивали его исходную фоновую активность и реакцию на колоректальное растяжение, затем (с интервалом 5 мин) — те же показатели после предварительной (за 20 с) стимуляции центрального ядра амигдалы. При этом в течение 40 с записывалась текущая фоновая активность нейрона, затем осуществлялось 10-секундное раздражение амигдалы и через 10 с после его окончания начинался 60-секундный период мониторирования постстимуляционных изменений в фоновой активности или производилось 60-секундное КРР. Для электрического раздражения центрального ядра использовали прямоугольные импульсы тока отрицательной полярности силой 200-300 мкА и длительностью 500 мкс, которые генерировали с помощью электростимулятора Isostim A320 (World Precision Instruments, США) и предъявляли с частотой 50 Гц в течение 10 с. Эксперименты проводили на двух группах крыс – здоровых (15 животных) или с колитом (12 особей), инициированным по методу Morris с соавт. [32] посредством трансректального введения в ободочную кишку спиртового раствора пикрилсульфониевой кислоты (TNBS, 20 мг в 0.25 мл 50%-ного раствора этанола; Sigma-Aldrich, США). Введение раствора осуществлялось с помощью инсулинового шприца, снабженного тонким 7-сантиметровым полиэтиленовым катетером. Опыты начинали через 5—12 дней после инъекции, на пике развития колита.

По окончании каждого эксперимента осуществляли эвтаназию животного путем внутривенного введения трехкратной дозы анестезирующей смеси и выполняли электролитическое разрушение ткани мозга посредством пропускания через регистрирующий и стимулирующий электроды постоянного тока силой 0.5–1.2 мА в течение 40 с. Локализацию мест регистрации и стимуляции производили на обработанных стандартными гистологическими методами (метод Ниссля) срезах мозга толщиной 40 мкм с использованием атласа мозга крысы [29]. В случае локализации регистрирующего или стимулирующего электродов за пределами границ исследуемых структур мозга результаты нейрофизиологического исследования данного животного были исключены из дальнейшего анализа. По завершении каждого опыта у здоровых крыс и животных, подвергнутых введению пикрилсульфониевой кислоты, был осуществлен забор фрагмента толстой кишки длиной 8 см от ануса для визуального анализа и последующего гистологического окрашивания (эозин и гематоксилин) с целью исключения спонтанной патологии у животных, отнесенных к группе здоровых, и гистологического подтверждения колита у крыс второй группы.

Статистическую обработку, сравнение и графическое оформление результатов, полученных в разных условиях и на разных группах животных, производили посредством программ Origin 2015 (OriginLab, США) и GraphPad InStat 3.02 (GraphPad Software, США). Статистический анализ полученных данных производился с использованием непараметрических методов для парных (тест Фридмана и парный тест Вилкоксона) и непарных (тесты Крускала—Уоллиса и Манна—Уитни) измерений. Применение непараметрических тестов было связано с отклонением анализируемых выборок от нормального распределения (тест Шапиро—Вилка). Данные представлены как медиана (25-й процентиль; 75-й процентиль). Различия считали статистически значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группе здоровых животных была зарегистрирована активность 145 нейронов кВЛРО продолговатого мозга, локализованных между двойным и латеральным ретикулярными ядрами (рис. 1*a*). Из них 128 (88.3%) клеток реагировали на ноцицеп-

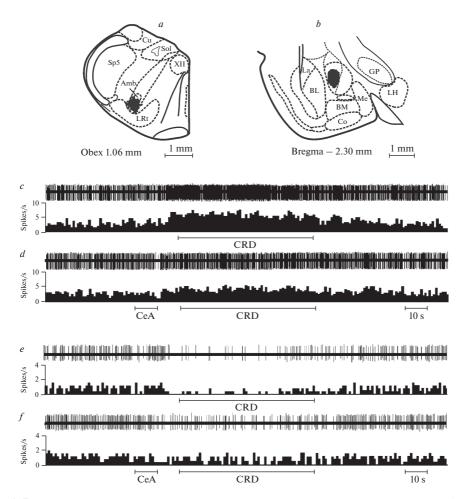


Рис. 1. Локализация мест регистрации нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга (a), область электрической стимуляции центрального ядра амигдалы (b) и примеры возбуждающей (c, d) и тормозной (e, f) нейрональных реакций на колоректальное растяжение изолированно (c, e) или после предварительной (за 20 с) активации центрального ядра амигдалы (d, f). Обозначения на (a): Amb — двойное ядро, Cu — клиновидное ядро, LRt — латеральное ретикулярное ядро, Sol — ядро одиночного тракта, Sp5 — спинальное ядро тройничного нерва, XII — ядро подъязычного нерва. Обозначения на (b): BL — базолатеральное ядро амигдалы, BM — базомедиальное ядро амигдалы, Co — кортикальное ядро амигдалы, GP — бледный шар, La — латеральное ядро амигдалы, LH — латеральный гипоталамус, Ме — медиальное ядро амигдалы. Схемы срезов мозга адаптированы из стандартного атласа мозга крысы [29]. Обозначения на (c-f): CRD — колоректальное растяжение, CeA — стимуляция центрального ядра амигдалы. В верхней части каждого фрагмента — нативные записи, ниже — соответствующие гистограммы. По оси абсцисс — время в секундах, по оси ординат — частота разрядов. Отрезки — время действия раздражений. Артефакты электрической стимуляции убраны с помощью амплитудного дискриминатора.

тивное колоректальное растяжение (КРР) значительными и пролонгированными во времени увеличением (n=78, p=0.03, Fr=7.29, тест Фридмана) или уменьшением частоты разрядов (n=50, p=0.04, Fr=6.24) и были отнесены к возбуждающимся и тормозящимся соответственно. Остальные 17 (11.7%) нейронов, активность которых во время и после КРР существенно не изменялась (p=0.08, Fr=5.06), рассматривались как индифферентные к применяемому висцеральному раздражению и были исключены из дальнейшего анализа эффектов стимуляции амигдалы. Указанные три типа нейронов характеризовались различающимися частотами фоновой активности (p<0.001, KW=35.3, тест Крускала—Уоллиса), что может служить подтверждением их принадлежности к функционально различным популяциям. Возбуждающиеся клетки генерировали фоновые разряды с частотой 0.7 (0.3; 1.3) имп/с, которая была существенно ниже, чем у тормозящихся (1.4 (1.1; 2.2); p<0.001, U=985, тест Манна—Уитни) и индифферентных нейронов (1.9 (1.5; 3.0); p<0.001, U=190). Из последних двух типов клеток более высокую частоту фоновой активности демонстрировали индифферентные к КРР клетки (p=0.04, U=283).

Возбуждающиеся при кишечном растяжении клетки (рис. 1c) составляли 53.8% от общего числа зарегистрированных нейронов. Вызванное KPP усиление их импульсной активности достигало 143.6 (128.1; 223.0)% от исходного (фонового) уровня (n=78, p<0.001, парный тест Вилкоксона) и сохранялось как минимум в течение 1 мин после окончания стимуляции (рис. 2a). В свою очередь, в популяции тормозящихся при KPP нейронов (рис. 1e), к которой были отнесены 34.5% изученных клеток, снижение частоты разрядов во время раздражения доходило до 71.3 (57.8; 78.6)% от ее исходного значения (n=50, p<0.001, парный тест Вилкоксона), оставаясь на сниженном уровне после прекращения KPP (рис. 2b).

Предварительная 10-секундная электрическая стимуляция латеральной части ЦеА (рис. 1b) у здоровых животных вызывала небольшое, но статистически значимое снижение частоты фоновой импульсации возбуждающихся при КРР нейронов (n = 78, p = 0.02, парный тест Вилкоксона; рис. 3a) и подавляла их ответы на висцеральное болевое раздражение (рис. 1a). Интенсивность последних после стимуляции ЦеА составляла 123.6 (86.6; 158.9)% от фоновой активности, что было суще-

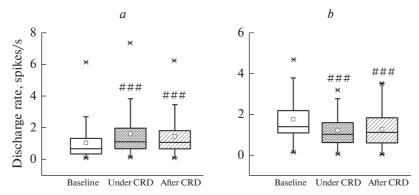


Рис. 2. Частота разрядов у возбуждающихся (a) и тормозящихся (b) в ответ на колоректальное растяжение (CRD) нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга у здоровых крыс исходно (Baseline), во время раздражения (Under CRD) и после его окончания (After CRD). Верхняя и нижняя границы каждого прямоугольника — первый и третий квартили (25-й и 75-й процентили) соответственно, поперечная линия внутри — медиана (50-й процентиль), квадрат внутри — среднее арифметическое, концы отрезков — 10-й и 90-й процентили, кресты — выбросы. Значимые различия по сравнению с соответствующим исходным значением (парный тест Вилкоксона): ### — p < 0.001.

ственно ниже, чем при изолированном применении KPP (n=78, p < 0.01, парный тест Вилкоксона; рис. 4a). Электрораздражение амигдалы не оказывало значимого влияния на частоту фоновых разрядов тормозящихся при кишечном растяжении нейронов (рис. 3b), но приводило к ослаблению их тормозных реакций на KPP (рис. 1f), либо к их трансформации в возбуждающие. В целом, вызванный KPP уровень импульсной активности этих нейронов после стимуляции ЦеА составлял 99.9 (63.2; 129.7)% от фонового значения, существенно превышая таковой при изолированном кишечном раздражении (n=50, p < 0.001, парный тест Вилкоксона; рис. 4b).

У крыс с колитом в исследуемой области продолговатого мозга (рис. 1a) было зарегистрировано 106 нейронов. Из них 38 (35.9%) клеток во время и после KPP демонстрировали усиление импульсной активности (p < 0.001, Fr = 42.37, тест Фридмана), а 51 нейрон (48.1%) — ее уменьшение (p < 0.001, Fr = 61.22). Остальные 17 (16%) клеток были индифферентными к болевой висцеральной стимуляции (p = 0.19, Fr = 3.29). Процентное соотношение разных типов нейронов при патологии существенно отличалось от такового в норме (p = 0.02, Chi-square = 7.9, тест хи-квадрат), характеризуясь меньшим процентом возбуждающихся и повышенной долей тормозящихся при KPP клеток (p = 0.009, точный тест Фишера) при сопоставимом с нормой соотношении реагирующих на раздражение и индифферентных к нему нейронов (p > 0.05, точный тест Фишера). Частоты фоновых разрядов указанных нейрональных типов существенно различались (p < 0.001, KW = 19.68, тест Крускала—Уоллиса), однако данная характеристика для каждого из них в отдельности была сопоставима с таковой у здоровых животных (для всех случаев p = 0.08—0.83, U = 93—1409, тест Манна—Уитни; рис. 3a, b).

У крыс с кишечным воспалением возбуждающая нейрональная реакция на КРР достигала 157.3 (130.3; 271.6)% от уровня фоновой импульсации, превышая соответствующее значение в норме (p=0.04, U=1018, тест Манна—Уитни; рис. 4a). Тормозящиеся нейроны в ответ на растяжение воспаленной кишки демонстрировали снижение импульсной активности до 68.2 (45.5; 78.2)% от ее фонового уровня, что не отличалось от сходной реакции в отсутствие патологии (p=0.30, U=1123, тест Манна—Уитни; рис. 4b).

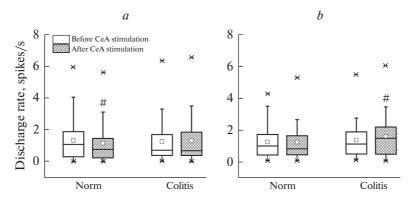


Рис. 3. Частота фоновых разрядов у нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга с возбуждающими (a) и тормозными (b) реакциями на колоректальное растяжение (CRD) до электрической стимуляции центрального ядра амигдалы (Before CeA stimulation) и после него (After CeA stimulation) у здоровых крыс (Norm) и животных с колитом (Colitis). Значимые различия по сравнению с соответствующим значением до активации амигдалы (парный тест Вилкоксона): # -p < 0.05. Остальные обозначения как на рис. 2.

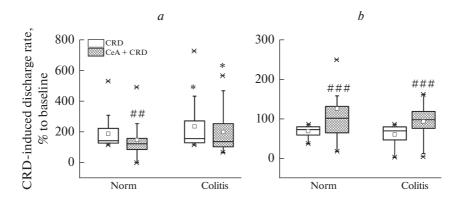


Рис. 4. Частота вызванных разрядов у нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга, возбуждающихся (a) и тормозящихся (b) при колоректальном растяжении, исходно (CRD) и после предварительной электрической стимуляции центрального ядра амигдалы (CeA + CRD) у здоровых крыс (Norm) и животных с колитом (Colitis). Значимые различия по сравнению с соответствующим значением до активации амигдалы (парный тест Вилкоксона): $^{\#\#} - p < 0.01$, $^{\#\#\#} - p < 0.001$. Значимые различия по сравнению с соответствующим значением в норме (тест Манна—Уитни): $^* - p < 0.05$. Остальные обозначения как на рис. 2.

Предварительная стимуляция ЦеА при колите, в отличие от ее тормозного действия в норме, не оказывала существенного влияния на частоты фоновых и вызванных KPP разрядов у клеток возбуждающегося типа (n = 38, p = 0.66 и p = 0.10соответственно, парный тест Вилкоксона). После такой стимуляции уровень импульсной активности нейрона во время кишечного раздражения составлял 137.6 (104.2; 253.9)% от ее фонового значения, превосходя соответствующий показатель после активации ЦеА в группе здоровых животных (p = 0.04, U = 1143, тест Манна— Уитни; рис. 4а). В свою очередь, кишечная патология сопровождалась усиливающим эффектом амигдалы на фоновую импульсацию тормозящихся при КРР клеток (n = 51, p = 0.03, парный тест Вилкоксона; рис. 3b), который не наблюдался в норме. При этом сохранялось амигдалофугальное подавление тормозных нейрональных ответов на болевое раздражение кишки (рис. 4b). Вызванный КРР уровень импульсной активности этих нейронов после стимуляции ЦеА в условиях патологии составлял 96.2 (74.6; 116.9)% от фонового значения, существенно превышая таковой при изолированном кишечном раздражении (n = 51, p < 0.001, парный тест Вилкоксона) и не отличаясь от соответствующего показателя у здоровых животных (p = 0.55, U = 1163, тест Манна-Уитни).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований нами впервые установлено, что электрическая стимуляция латеральной части ЦеА оказывает подавляющее действие на нейрональные процессы обработки ноцицептивных сигналов от толстой кишки в кВЛРО продолговатого мозга, которое проявляется в уменьшении возбуждающих и ослаблении тормозных реакций бульбарных нейронов на болевое колоректальное растяжение. Впервые показано, что кишечное воспаление (колит) сопровождается ослаблением угнетающих влияний ЦеА на возбуждающиеся в ответ на висцеральное ноцицептивное воздействие клетки кВЛРО при сохранении амигдалофугального подавления вызываемого КРР нейронального торможения.

Каудальная вентролатеральная ретикулярная формация продолговатого мозга общепризнанно считается центром интеграции кардиоваскулярных и моторных рефлекторных реакций, в том числе инициируемых ноцицептивными раздражителями, и является важным звеном эндогенной системы контроля болевой чувствительности [2, 28, 33, 34]. Ранее было установлено, что эта область, получающая висцеросенсорную информацию от восходящих спиноталамического, спиноретикулярного и спиномезенцефалического трактов [27, 35], содержит специфические популяции реагирующих на кишечное растяжение нейронов, изменения в активности которых могут служить индикатором супраспинального проведения болевых сигналов от толстой кишки [35-38]. Наше исследование свидетельствует о существовании в кВЛРО двух групп нейронов – возбуждающихся и тормозящихся в ответ на ноцицептивное колоректальное растяжение. Это согласуется с результатами других работ [36, 38] и совпадает с ранее полученными нами данными [39-41]. Кроме того, сходные по свойствам группы нейронов обнаружены в люмбосакральном и тораколюмбальном отделах спинного мозга [42], ядре одиночного тракта [41, 43], большом ядре шва [44], вентральном заднелатеральном ядре таламуса [45] и передней инсулярной коре [46].

Выявленное нами различие в фоновой импульсной активности возбуждающихся и тормозящихся при КРР нейронов кВЛРО подтверждает их принадлежность к функционально различным популяциям. Имеющиеся иммуногистохимические данные указывают, что возбуждающиеся при растяжении кишки клетки ВЛРО, по крайней мере частично, могут быть катехоламинергическими [47, 48]. По мнению ведущих специалистов в этой области, такие клетки имеют непосредственное отношение к механизмам восходящего проведения висцерального болевого сигнала и могут быть отнесены к специфическим висцеральным ноцицептивным нейронам [36, 38, 49]. Эту точку зрения поддерживают результаты наших предыдущих работ, в которых возбуждающаяся при КРР группа нейронов являлась мишенью для действия фармакологических препаратов со свойствами висцеральных анальгетиков [39, 50, 51] и демонстрировала признаки сенситизации при кишечном воспалении [40, 41]. Наблюдавшееся нами в данном исследовании снижение реактивности таких бульбарных клеток к КРР после электростимуляции ЦеА может свидетельствовать об антиноцицептивном действии амигдалы, вследствие которого представляется уместным ожидать ослабления исходящего из кВЛРО висцерального болевого потока к вышележащим структурам мозга.

Нейрохимическая и функциональная принадлежность тормозящихся в ответ на кишечную стимуляцию бульбарных нейронов в настоящее время не определена. На основании сходства этих клеток кВЛРО по своим свойствам с тормозными off-нейронами рострального вентромедиального отдела продолговатого мозга ряд авторов связывает их с функционированием бульбарной антиноцицептивной системы [38, 49]. Вместе с тем, наши предыдущие исследования показали, что такие клетки могут участвовать в процессах дифференцировки соматических и висцеральных болевых сигналов [41]. Кроме того, по крайней мере часть из них может быть вовлечена в реализацию продемонстрированных ранее гипотензивных кардиоваскулярных реакций на висцеральную ноцицепцию [41, 51, 52], которые могут обеспечиваться вазодепрессорной (симпатоингибирующей) кВЛРО [33, 34] посредством ее тормозно-возбуждающих нейрональных взаимодействий с симпатоактивирующей ростральной вентролатеральной ретикулярной областью продолговатого мозга [2, 28, 53]. Более конкретная функциональная идентификация тормозящихся при ноцицептивной кишечной стимуляции нейронов кВЛРО требует проведения специальных исследований. Наблюдавшееся в наших экспериментах уменьшение тормозных нейрональных реакций кВЛРО на кишечное растяжение после активации ЦеА может свидетельствовать в пользу амигдалофугального подавления не только возбуждающей, но и тормозной нейротрансмиссии висцеральных болевых сигналов в исследованной области продолговатого мозга, следствием чего может являться уменьшение всех вызываемых ими рефлекторных реакций бульбарного уровня. Продемонстрированное в нашем исследовании общее тормозное влияние ЦеА на бульбарные механизмы обработки висцеральных болевых сигналов согласуется с антиноцицептивными эффектами его стимуляции нейропептидами и агонистами нейротрансмиттеров на моделях соматической боли у бодрствующих животных [31, 54, 55].

Эффекты стимуляции латеральной части ЦеА могут реализоваться как через ее собственные нисходящие проекции, так и через связи активируемой ею медиальной части ядра [3, 30, 31], то есть через нисходящие пути ЦеА в целом. В частности, тормозные амигдалофугальные влияния на связанные с висцеральной ноцицепцией нейроны продолговатого мозга могут реализоваться через относительно слабо выраженные, но все же существующие прямые ГАМК-ергические проекции ЦеА на кВЛРО [1, 56–58]. Активация этих входов может приводить к подавлению возбуждающих нейрональных реакций этой бульбарной области на КРР. Эти же амигдалофугальные проекции способны подавлять активность присутствующих в кВЛРО ноцицептивных ГАМК-ергических нейронов [59], ослабляя тем самым инициируемую КРР локальную тормозную нейротрансмиссию. Существенную роль в обеспечении выявленных эффектов ЦеА могут играть его более массивные ингибиторные входы к ростральной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга и ядру одиночного тракта [1, 57, 58], которые, как известно, оказывают активирующие влияния на кВЛРО [57, 60, 61]. Поэтому общее снижение возбуждающей нейрональной активности последней частично может быть следствием амигдалофугального торможения нейронов указанных бульбарных областей. В то же время, имеющиеся в меньшем количестве глутаматергические проекции от ЦеА к этим же структурам [62] могут способствовать усилению их активирующих входов в кВЛРО с последующим ослаблением тормозных реакций части ее нейронов на растяжение кишки. Кроме вышеперечисленного, продемонстрированные нами модулирующие влияния ЦеА на возбуждающую и тормозную висцеральную ноцицептивную трансмиссию в кВЛРО могут быть опосредованы вентролатеральной областью центрального серого вещества среднего мозга — одним из ключевых компонентов эндогенной системы контроля болевой чувствительности [56, 63-65].

Как впервые показало наше исследование, развитие колита сопровождается ослаблением тормозных влияний ЦеА на активирующиеся при колоректальном растяжении нейроны кВЛРО, что может свидетельствовать о нарушении амигдалобульбарных влияний в этих условиях. Одной из причин может являться вызываемое кишечным воспалением усиление глутаматергической нейротрансмиссии в пределах исследуемого амигдалярного ядра [21, 66], которое может способствовать ослаблению тормозных ГАМК-ергических и усилению возбуждающих глутаматергических влияний ЦеА на кВЛРО и/или активирующие ее бульбарные структуры. Сходное усиление глутамат-зависимой нейрональной активности в ЦеА было продемонстрировано при соматических патологиях – артрите и периферической нейропатии [30, 31, 67]. Одним из свидетельств в пользу усиления возбуждающих амигдалярных влияний при кишечном воспалении может являться наблюдавшееся нами после стимуляции ЦеА увеличение уровня фоновой активности тормозящихся при КРР бульбарных нейронов, которое отсутствовало у здоровых животных. В связи с этим представляется закономерным, что вызываемое ЦеА ослабление тормозных нейрональных реакций на растяжение кишки при таких условиях сохранялось, тогда как его подавляющие, вероятнее всего ГАМК-зависимые, эффекты на фоновую и вызванную активность возбуждающихся ноцицептивных нейронов кВЛРО были существенно ослаблены. В своей совокупности такие опосредуемые локальными глутаматергическими механизмами изменения в нисходящих влияниях ЦеА при колите могут способствовать усилению висцеральной болевой трансмиссии при по-прежнему ослабленной, т. е. неадекватной, реализации инициируемых ею антиноцицептивных и кардиоваскулярных рефлекторных реакций бульбарного уровня. Косвенным подтверждением справедливости этого предположения является продемонстрированное ранее усиление кишечной болевой чувствительности у бодрствующих мышей после фармакологической активации в ЦеА метаботропных глутаматных рецепторов [11].

Определенную роль в способствующих ноцицепции перестройках амигдалофугальных влияний при кишечном воспалении также может играть ассоциированное с ним увеличение в ЦеА уровня экспрессии кортикотропин-рилизинг-фактора [23]. Ранее было установлено, что микроинъекции кортикотропин-рилизинг-гормона в это ядро способствует усилению реакции бодрствующего животного на ноцицептивное колоректальное растяжение [6, 12, 13], тогда как блокада локального синтеза указанного гормона или антагонизм его рецепторов 1-го типа уменьшал кишечную гиперчувствительность [12, 14, 15]. Имеющиеся к настоящему времени экспериментальные данные позволяют предполагать, что повышенный уровень локального кортикотропин-рилизинг-фактора может усиливать опосредуемые им возбуждающие влияния ЦеА на клетки паравентрикулярного ядра гипоталамуса [68-70]. Измененный уровень амигдалофугальной активации последнего, в свою очередь, может приводить к смещению баланса его возбуждающих и тормозных модулирующих влияний на кВЛРО в сторону более выраженного возбуждения [71-73], способствуя тем самым усилению висцеральной болевой трансмиссии в этой структуре.

Таким образом, в нашем исследовании впервые продемонстрировано, что центральное ядро амигдалы оказывает тормозное действие на нейрональные процессы обработки висцерального болевого сигнала в каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга, что может приводить к уменьшению восходящего ноцицептивного потока и инициируемых им рефлекторных реакций бульбарного уровня. Установлено, что угнетающий эффект активации центральной амигдалы на вызываемое кишечным растяжением возбуждение бульбарных ретикулярных нейронов существенно ослабевает при колите, свидетельствуя о нарушении антиноцицептивных амигдалобульбарных влияний при висцеральной патологии. Такие нарушения могут способствовать усилению супраспинальной трансмиссии ноцицептивных сигналов от толстой кишки, т.е. лежать в основе центральных механизмов патогенеза кишечной гипералгезии и хронической абдоминальной боли при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения конкретных анатомических путей и нейрохимических процессов, вовлеченных в реализацию антиноцицептивных амигдалобульбарных влияний и их нарушения при висцеральной патологии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013—2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАЛ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.А.Л.), сбор данных (И.Б.С., И.И.Б.), обработ-ка данных (О.А.Л., И.Б.С.), написание и редактирование манускрипта (О.А.Л., И.Б.С., И.И.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Любашина ОА, Пантелеев СС, Ноздрачев АД (2009) Амигдалофугальная модуляция вегетативных центров мозга. СПб Наука. [Ljubashina OA, Panteleev SS, Nozdrachev AD (2009) Amigdalofugal'naja moduljacija vegetativnyh centrov mozga [Amygdalofugal modulation of the autonomic centers of the brain]. SPb Nauka (In Russ)].
- Benarroch EE (2012) Central autonomic control. In: Robertson D, Biaggioni I, Burnstock G, Low PA, Paton JFR (eds) Primer on the autonomic nervous system. 3rd ed. Elsevier Amsterdam. 9–12. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00002-0
- 3. *Pitkänen A* (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton JP (ed) The amygdala: a functional analysis. Oxford Univer Press New York 31–115.
- 4. *Browning KN, Travagli RA* (2014) Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. Compr Physiol 4(4): 1339–1368. https://doi.org/10.1002/cphy.c130055
- 5. Critchley HD, Harrison NA (2013) Visceral influences on brain and behavior. Neuron 77(4): 624–638. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.008
- Meerveld BG, Johnson AC (2018) Mechanisms of stress-induced visceral pain. J Neurogastroenterol Motil 24(1): 7–18. https://doi.org/10.5056/jnm17137
- 7. Bonaz B, Baciu M, Papillon E, Bost R, Gueddah N, Le Bas JF, Fournet J, Segebarth C (2002) Central processing of rectal pain in patients with irritable bowel syndrome: an fMRI study. Am J Gastroenterol 97(3): 654–661. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05545.x
- 8. Rubio A, Pellissier S, Van Oudenhove L, Ly HG, Dupont P, Tack J, Dantzer C, Delon-Martin C, Bonaz B (2016) Brain responses to uncertainty about upcoming rectal discomfort in quiescent Crohn's disease a fMRI study. Neurogastroenterol Motil 28(9): 1419—1432. https://doi.org/10.1111/nmo.12844
- 9. Lazovic J, Wrzos HF, Yang QX, Collins CM, Smith MB, Norgren R, Matyas K, Ouyang A (2005) Regional activation in the rat brain during visceral stimulation detected by c-fos expression and fMRI. Neurogastroenterol Motil 17(4): 548–556. https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00655.x
- Nakagawa T, Katsuya A, Tanimoto S, Yamamoto J, Yamauchi Y, Minami M, Satoh M (2003) Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats. Neurosci Lett 344(3): 197–200. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00465-8
- 11. Crock LW, Kolber BJ, Morgan CD, Sadler KE, Vogt SK, Bruchas MR, Gereau RW (2012) Central amygdala metabotropic glutamate receptor 5 in the modulation of visceral pain. J Neurosci 32(41): 14217–14226. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1473-12.2012
- 12. *Prusator DK, Greenwood-Van Meerveld B* (2017) Amygdala-mediated mechanisms regulate visceral hypersensitivity in adult females following early life stress: importance of the glucocorticoid receptor and corticotropin-releasing factor. Pain 158(2): 296–305. https://doi.org/10.1097/j.pain.00000000000000759
- Su J, Tanaka Y, Muratsubaki T, Kano M, Kanazawa M, Fukudo S (2015) Injection of corticotropin-releasing hormone into the amygdala aggravates visceral nociception and induces noradrenaline release in rats. Neurogastroenterol Motil 27(1): 30–39. https://doi.org/10.1111/nmo.12462
- Johnson AC, Tran L, Greenwood-Van Meerveld B (2015) Knockdown of corticotropin-releasing factor in the central amygdala reverses persistent viscerosomatic hyperalgesia. Transl Psychiatry 5(3): e517. https://doi.org/10.1038/tp.2015.16
- 15. *Taché Y*(2015) Corticotrophin-releasing factor 1 activation in the central amygdale and visceral hyperalgesia. Neurogastroenterol Motil 27(1): 1–6. https://doi.org/10.1111/nmo.12495
- 16. Bao CH, Liu P, Liu HR, Wu LY, Shi Y, Chen WF, Qin W, Lu Y, Zhang JY, Jin XM, Wang XM, Zhao JM, Liu XM, Tian J, Wu HG (2015) Alterations in brain grey matter structures in patients with crohn's disease and their correlation with psychological distress. J Crohns Colitis 9(7): 532–540.
 - https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv057

- 17. Jarcho JM, Feier NA, Bert A, Labus JA, Lee M, Stains J, Ebrat B, Groman SM, Tillisch K, Brody AL, London ED, Mandelkern MA, Mayer EA (2013) Diminished neurokinin-1 receptor availability in patients with two forms of chronic visceral pain. Pain 154(7): 987–996. https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.02.026
- 18. Nair VA, Beniwal-Patel P, Mbah I, Young BM, Prabhakaran V, Saha S (2016) Structural imaging changes and behavioral correlates in patients with Crohn's disease in remission. Front Hum Neurosci 10: 460. https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00460
- 19. Agostini A, Filippini N, Benuzzi F, Bertani A, Scarcelli A, Leoni C, Farinelli V, Riso D, Tambasco R, Calabrese C, Rizzello F, Gionchetti P, Ercolani M, Nichelli P, Campieri M (2013) Functional magnetic resonance imaging study reveals differences in the habituation to psychological stress in patients with Crohn's disease versus healthy controls. J Behav Med 36(5): 477–487. https://doi.org/10.1007/s10865-012-9441-1
- 20. Jain P, Hassan AM, Koyani CN, Mayerhofer R, Reichmann F, Farzi A, Schuligoi R, Malle E, Holzer P (2015) Behavioral and molecular processing of visceral pain in the brain of mice: impact of colitis and psychological stress. Front Behav Neurosci 9: 177. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00177
- 21. *Ji G, Li Z, Neugebauer V* (2015) Reactive oxygen species mediate visceral pain-related amygdala plasticity and behaviors. Pain 156(5): 825–836. https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000120
- 22. *Reichmann F, Painsipp E, Holzer P* (2013) Environmental enrichment and gut inflammation modify stress-induced c-Fos expression in the mouse corticolimbic system. PLoS One 8(1): e54811. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054811
- 23. Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Schulkin J, Myers DA (2006) Long-term expression of corticotropin-releasing factor (CRF) in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in response to an acute colonic inflammation. Brain Res 1071(1): 91–96. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.071
- 24. Reichmann F, Hassan A, Farzi A, Jain P, Schuligoi R, Holzer P (2015) Dextran sulfate sodium-induced colitis alters stress-associated behaviour and neuropeptide gene expression in the amygdala-hippocampus network of mice. Sci Rep 5: 9970. https://doi.org/10.1038/srep09970
- 25. Moshiree B, Zhou Q, Price DD, Verne GN (2006) Central sensitisation in visceral pain disorders. Gut 55(7): 905–958. https://doi.org/10.1136/gut.2005.078287
- Siegel CA, MacDermott RP (2009) Is chronic pain an extraintestinal manifestation of IBD? Inflammatory Bowel Diseases 15(5): 769–771. https://doi.org/10.1002/ibd.20844
- 27. *Al-Chaer ED, Willis WD* (2007) Neuroanatomy of visceral pain: pathways and processes. In: *Pasricha PJ, Willis WD, Gebhart GF* (eds) Chronic abdominal and visceral pain. Theory and practice. New York Informa Healthcare USA 33–44.
- Cortelli P, Giannini G, Favoni V, Cevoli S, Pierangeli G (2013) Nociception and autonomic nervous system. Neurol Sci 34(Suppl 1): S41–S46. https://doi.org/10.1007/s10072-013-1391-z
- 29. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed London Acad Press.
- 30. *Neugebauer V* (2015) Amygdala pain mechanisms. Handb Exp Pharmacol 227: 261–284. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2 13
- 31. *Veinante P, Yalcin I, Barrot M* (2013) The amygdala between sensation and affect: a role in pain. J Mol Psychiatr 1(1): 9. https://doi.org/10.1186/2049-9256-1-9
- 32. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology 96 (3): 795–803. PMID: 2914642
- 33. *Martins I, Tavares I* (2017). Reticular formation and pain: the past and the future. Front Neuroanat 11: 51. https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00051
- 34. *Tavares I, Lima D* (2007) From neuroanatomy to gene therapy: searching for new ways to manipulate the supraspinal endogenous pain modulatory system. J Anat 211(2): 261–268. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00759.x
- 35. Robbins MT, Uzzell TW, Aly S, Ness TJ (2005) Visceral nociceptive input to the area of the medullary lateral reticular nucleus ascends in the lateral spinal cord. Neurosci Lett 381(3): 329–333. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.02.046
- 36. Ness TJ, Follett KA, Piper J, Dirks BA (1998) Characterization of neurons in the area of the medullary lateral reticular nucleus responsive to noxious visceral and cutaneous stimuli. Brain Res

- 802(1-2): 163-174.
- https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00608-8
- 37. Panteleev SS, Martseva AA, Lyubashina OA (2015) The inhibitory effect of granisetron on ventrolateral medulla neuron responses to colorectal distension in rats. Eur J Pharmacol 749: 49–55. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.002
- 38. *Pinto-Ribeiro F, Ansah OB, Almeida A, Pertovaara A* (2011) Response properties of nociceptive neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) in monoarthritic and healthy control rats: modulation of responses by the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). Brain Res Bull 86(1–2): 82–90. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.06.014
- 39. Lyubashina OA, Sivachenko IB, Panteleev SS, Nozdrachev AD (2016) Effects of 5-HT3 receptor blockade on visceral nociceptive neurons in the ventrolateral reticular field of the rat medulla oblongata. J Evol Biochem Phys 52(4): 313–325. https://doi.org/10.1134/S0022093016040062
- 40. Lyubashina OA, Sivachenko IB, Busygina II, Panteleev SS (2018) Colitis-induced alterations in response properties of visceral nociceptive neurons in the rat caudal medulla oblongata and their modulation by 5-HT3 receptor blockade. Brain Res Bull 142: 183–196. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.07.013
- 41. Lyubashina OA, Sivachenko IB, Sokolov AY (2019) Differential responses of neurons in the rat caudal ventrolateral medulla to visceral and somatic noxious stimuli and their alterations in colitis. Brain Res Bull 152: 299–310. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.07.030
- 42. Wang G, Tang B, Traub RJ (2005) Differential processing of noxious colonic input by thoracolumbar and lumbosacral dorsal horn neurons in the rat. J Neurophysiol 94 (6): 3788–3794. https://doi.org/10.1152/in.00230.2005
- 43. *Panteleev SS, Sivachenko IB, Lyubashina OA* (2021) The buspirone-dependent abdominal pain transmission within the nucleus tractus solitarius in the rat. Neuroscience 452: 326–334. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.032
- 44. *Brink TS, Mason P* (2003) Raphe magnus neurons respond to noxious colorectal distension. J Neurophysiol 89(5): 2506–2015. https://doi.org/10.1152/jn.00825.2002
- 45. Zhang HQ, Al-Chaer ED, Willis WD (2002) Effect of tactile inputs on thalamic responses to noxious colorectal distension in rat. J Neurophysiol 88(3): 1185–1196. https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.3.1185
- 46. *Gao J, Wu X, Owyang C, Li Y* (2006) Enhanced responses of the anterior cingulate cortex neurones to colonic distension in viscerally hypersensitive rats. J Physiol 570(Pt 1): 169–183. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.096073
- 47. Han F, Zhang YF, Li YQ (2003) Fos expression in tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat brainstem after visceral noxious stimulation: an immunohistochemical study. World J Gastroenterol 9(5): 1045–1050. https://doi.org/10.3748/wig.v9.i5.1045
- 48. Wang L, Martínez V, Larauche M, Taché Y (2009) Proximal colon distension induces Fos expression in oxytocin-, vasopressin-, CRF- and catecholamines-containing neurons in rat brain. Brain Res 1247: 79–91. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.094
- 49. *Almeida A, Leite-Almeida H, Tavares I* (2006) Medullary control of nociceptive transmission: Reciprocal dual communication with the spinal cord. Drug Discov Today Dis Mech 3(3): 305–312. https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2006.09.001
- Lyubashina OA, Sivachenko IB (2017) The 5-HT4 receptor-mediated inhibition of visceral nociceptive neurons in the rat caudal ventrolateral medulla. Neuroscience 359: 277–288. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.039
- 51. Panteleev SS, Sivachenko IB, Lyubashina OA (2018) The central effects of buspirone on abdominal pain in rats. Neurogastroenterol Motil 30(11): e13431. https://doi.org/10.1111/nmo.13431
- 52. Пантелеев СС, Сиваченко ИБ, Бусыгина ИИ, Любашина ОА (2020) Эффекты стимуляции инфралимбической коры на реакции нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной формации, вызванные ноцицептивным раздражением толстой кишки крысы. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 106(12): 1524—1540. [Panteleev SS, Sivachenko IB, Busygina II, Lyubashina OA (2020) Effects of the infralimbic cortex stimulation on the caudal ventrolateral reticular formation neuron responses to the nociceptive rat colon distension. Russ J Physiol 106(12): 1524—1540. [In Russ)]. https://doi.org/10.31857/S0869813920120067
- 53. Campos RR, Carillo BA, Oliveira-Sales EB, Silva AM, Silva NF, Futuro Neto HA, Bergamaschi CT (2008). Role of the caudal pressor area in the regulation of sympathetic vasomotor tone. Braz J Med Biol Res 41(7): 557–562. https://doi.org/10.1590/s0100-879x2008000700002

- 54. *Han Y, Yu LC* (2009) Involvement of oxytocin and its receptor in nociceptive modulation in the central nucleus of amygdala of rats. Neurosci Lett 454(1): 101–104. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.062
- 55. Ortiz JP, Heinricher MM, Selden NR (2007) Noradrenergic agonist administration into the central nucleus of the amygdala increases the tail-flick latency in lightly anesthetized rats. Neuroscience 148(3): 737–743. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.003
- 56. Cobos A, Lima D, Almeida A, Tavares I (2003) Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral medulla: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. Neuroscience 120(2): 485–498. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00209-4
- 57. Saha S (2005) Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. Clin Exp Pharmacol Physiol 32(5–6): 450–456. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04210.x
- 58. *Jia HG*, *Rao ZR*, *Shi JW* (1997) Evidence of gamma-aminobutyric acidergic control over the catecholaminergic projection from the medulla oblongata to the central nucleus of the amygdala. J Comp Neurol 381(3): 262–281. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970512)381:3<262::aid-cne2>3.0.co;2-0
- 59. *Pinto M, Lima D, Castro-Lopes J, Tavares I* (2003) Noxious-evoked c-fos expression in brainstem neurons immunoreactive for GABAB, mu-opioid and NK-1 receptors. Eur J Neurosci 17(7): 1393–1402. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02586.x
- 60. Gieroba ZJ, Li YW, Blessing WW (1992) Characteristics of caudal ventrolateral medullary neurons antidromically activated from rostral ventrolateral medulla in the rabbit. Brain Res 582(2): 196–207. https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90133-t
- 61. Oshima N, Kumagai H, Iigaya K, Onimaru H, Kawai A, Nishida Y, Saruta T, Itoh H (2012) Baroexcited neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) recorded using the whole-cell patch-clamp technique. Hypertens Res 35(5): 500–506. https://doi.org/10.1038/hr.2011.211
- 62. Chapp AD, Gui L, Huber MJ, Liu J, Larson RA, Zhu J, Carter JR, Chen QH (2014) Sympathoexcitation and pressor responses induced by ethanol in the central nucleus of amygdala involves activation of NMDA receptors in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 307(5): H701—H709. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00005.2014
- 63. *Li JN*, *Sheets PL* (2018) The central amygdala to periaqueductal gray pathway comprises intrinsically distinct neurons differentially affected in a model of inflammatory pain. J Physiol 596(24): 6289–6305. https://doi.org/10.1113/JP276935
- 64. *Benarroch EE* (2012) Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. Neurology 78(3): 210–217. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823fcdee
- 65. Samineni VK, Grajales-Reyes JG, Copits BA, O'Brien DE, Trigg SL, Gomez AM, Bruchas MR, Gereau RW 4th (2017) Divergent modulation of nociception by glutamatergic and GABAergic neuronal subpopulations in the periaqueductal gray. eNeuro 4(2):ENEURO.0129-16.2017. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0129-16.2017
- 66. Ji G, Neugebauer V (2010) Reactive oxygen species are involved in group I mGluR-mediated facilitation of nociceptive processing in amygdala neurons. J Neurophysiol 104(1): 218–229. https://doi.org/10.1152/jn.00223.2010
- 67. *Gonçalves L, Dickenson AH* (2012) Asymmetric time-dependent activation of right central amygdala neurones in rats with peripheral neuropathy and pregabalin modulation. Eur J Neurosci 36(9): 3204–3213. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08235.x
- 68. Lyubashina OA, Itsev DE (2007) NO-Dependent mechanisms of amygdalofugal modulation of hypothalamic autonomic neurons. Neurosci Behav Physiol 37(9): 895–901. https://doi.org/10.1007/s11055-007-0096-2
- 69. Callahan LB, Tschetter KE, Ronan PJ (2013) Inhibition of corticotropin releasing factor expression in the central nucleus of the amygdala attenuates stress-induced behavioral and endocrine responses. Front Neurosci 7: 195. https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00195
- 70. Marcilhac A, Siaud P (1997) Identification of projections from the central nucleus of the amygdala to the paraventricular nucleus of the hypothalamus which are immunoreactive for corticotrophin-releasing hormone in the rat. Exp Physiol 82(2): 273–281. https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004022
- 71. Bowman BR, Kumar NN, Hassan SF, McMullan S, Goodchild AK (2013) Brain sources of inhibitory input to the rat rostral ventrolateral medulla. J Comp Neurol 521(1): 213–232. https://doi.org/10.1002/cne.23175

- 72. Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC, Loewy AD (2010) Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. J Comp Neurol 518(9): 1460–1499. https://doi.org/10.1002/cne.22283
- 73. Yang Z, Coote J (1999) The influence of the paraventricular nucleus on baroreceptor dependent caudal ventrolateral medullary neurones of the rat. Pflügers Arch 438(1): 47–52. https://doi.org/10.1007/s004240050878

Amygdalofugal Modulation of Visceral Nociceptive Transmission in the Rat Caudal Ventrolateral Medulla in Normal Conditions and under Intestinal Inflammation

O. A. Lyubashina^{a, *}, I. B. Sivachenko^a, and I. I. Busygina^a

^a Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia *e-mail: lvubashinaoa@infran.ru

The amygdala is a key brain limbic structure providing central regulation of the autonomic nervous system. The central nucleus of the amygdala (CeA) is assigned a leading role in the emotional and affective states-determined assessment and modulation of viscerosensory information entering the brain, including nociceptive signals from the gastrointestinal tract. Recently obtained data on the neuroplastic alterations in CeA occurring under colonic inflammation suggest that peripheral pathology can influence amygdaloid control of visceral pain signaling. However, the specific mechanisms underlying such control as well as their changes in organic diseases remain poorly understood, hindering the development of effective abdominal pain treatment. The aim of our neurophysiological experiments in anesthetized rats was to determine the neuronal mechanisms that provide amygdalofugal modulation of the medullary visceral nociceptive transmission with parallel evaluation of these mechanisms' implementation under intestinal inflammation. For this purpose, the effects of CeA electrical stimulation on nociceptive colorectal distension (CRD)-evoked spike activity of neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) were studied in healthy animals and rats with experimental colitis. It was found that CeA exerts the suppressive effect on the CVLM neuronal processing of nociceptive signals from the colon, which manifests itself in a decrease of excitatory and weakening of inhibitory medullary neurons' responses to CRD. The effect observed can contribute to an attenuation of the ascending pain flow as well as of the pain-triggered reflex reactions realized at the medullary level, being therefore considered as antinociceptive. It was shown for the first time that colitis is accompanied by a decrease in the inhibitory influence of CeA on CRD-excited CVLM cells with maintaining amygdalofugal suppression of the inhibitory nociceptive neuronal reactions. The revealed changes can lead to an increase in the supraspinal transmission of pain signals from the colon, i.e. they can underlie central mechanisms of the intestinal hyperalgesia and chronic abdominal pain pathogenesis.

Keywords: amygdala central nucleus, caudal ventrolateral medulla, intestinal nociception, neuronal activity, colitis

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ==

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОФРУКТОЗНОЙ ДИЕТЫ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ САМОК КРЫС НОКАУТНОЙ ЛИНИИ ТААРЯ-КО

© 2021 г. С. А. Апрятин^{1, 2, *}, И. С. Жуков^{1, 2}, А. Л. Манасян¹, Р. З. Муртазина², Т. А. Хунагов³, А. И. Лезина⁴, В. М. Клименко¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия ²Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия ⁴Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия *E-mail: apryatin@mail.ru

> Поступила в редакцию 12.04.2021 г. После доработки 15.07.2021 г. Принята к публикации 19.07.2021 г.

Открытие системы следовых аминов и их рецепторов двадцать лет назад дало новые перспективы в изучении моноаминовых систем мозга. Тем не менее, из 6 рецепторов следовых аминов, которые были обнаружены у человека, мышей и крыс, достаточно хорошо изучен только рецептор TAAR1 и его лиганды. Биологические функции остальных 5 рецепторов в настоящее время остаются неизвестными. В ходе данной работы была проведена оценка результатов поведенческих, биохимических и морфологических параметров нокаутной линии крыс TAAR9-КО, получавших 20%-ный раствор фруктозы вместо воды в течение 2 месяцев. Физиологические изменения были исследованы в поведенческих тестах "Открытое поле", "Приподнятый крестообразный лабиринт" и "Водный лабиринт Морриса", а также ключевые характеристики микростуктуры груминга. В результате были выявлены существенные различия в поисковой активности, "норковом рефлексе", терморегуляции, изменения ряда биохимических параметров и накоплении липидов в паренхиме печени у крыс, нокаутных по гену *ТААR9*.

Ключевые слова: следовые амины, поведение, фруктоза, TAAR9, груминг

DOI: 10.31857/S0869813921100022

ВВЕДЕНИЕ

Следовые амины (CA) являются независимой группой эндогенных аминов, которые образуются в различных органах и тканях в результате декарбоксилирования аминокислот. Кроме того, CA образуются при ферментативной или термической обработке продуктов питания с участием микрофлоры желудочно-кишечного тракта [1-3]. Показано, что моноаминовые нейромедиаторы (дофамин, серотонин, норадреналин) метаболизируются с образованием CA [4-7].

С тех пор как в 2001 г. были открыты рецепторы СА [8, 9], данный тип соединений стал рассматриваться как отдельная группа эндогенных моноаминов, обладающих независимым путем рецепции и принимающих участие в патогенезе функ-

циональных нарушений моноаминовых систем, алиментарно-зависимых и других заболеваний [2].

На сегодняшний день у разных видов открыто более 100 рецепторов СА. Для человека выявлено шесть функционально-активных рецепторов — TAAR1, 2, 5, 6, 8, 9 и три псевдогена — TAAR3, 4 и 7[2, 10].

Одним из наименее изученных подсемейств рецепторов СА у млекопитающих является TAAR9. Информации по биологической функции этого рецептора в настоящее время очень мало. В ряде исследований установлено, как и в случае с TAAR8, что различные популяции лейкоцитов экспрессировали TAAR9 [11, 12]. Показано, что TAAR9 экспрессируется также в селезенке человека [13], в кишечнике мыши [14], гипофизе и скелетных мышцах человека [15].

Одним из современных и хорошо зарекомендовавших себя методов выявления новых физиологических и метаболических функций генов является применение метаболической нагрузки в виде кормления высококалорийными рационами или поения растворами простых углеводов нокаутных по изучаемом гену линий лабораторных животных [11, 14].

Таким образом, целью исследования явилось изучение влияния высокофруктозного рациона на поведенческие, биохимические и морфологические параметры крыс нокаутной линии TAAR9-KO.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные животные

В исследовании использовались самки крыс нокаутной линии TAAR9-КО и контрольные животные ("дикий тип", WT, аутбредная линия Spague-Dawley) в возрасте 5-6 мес. (n=32), полученные из вивария Института трансляционной биомедицины СПбГУ. Животные, согласно генотипам и потребляемым рационам, были разделены на 6 групп. Средняя исходная масса тела в группах не различалась.

Крысы содержались в режиме 12 : 12 ч (день : ночь). Все процедуры были выполнены в соответствии с руководящими принципами, установленными Советом Европейского сообщества (Директива 2010/63 /ЕС от 22 сентября 2010 г.).

Генотипирование

Генотипирование животных основано на методе ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов). Генотипирование проводится при помощи ПЦР с ДНК, выделенной методом щелочного лизиса [16] из образца ткани, взятого из хвоста животного, и праймерами, фланкирующими сайт мутации (5'-TGGCCTTTTGCAAGAAGTTT-3' and 5'-GCAAAGCAGAAGGAGGTGTC-3'). ПЦР проводится в буфере, содержащем 2× BioMaster HS-Taq PCR-Color reaction mix (Biolab mix, Россия), 1 мкМ каждого праймера и 500 нг геномной ДНК. Условия ПЦР: 3 мин при 95°C, 35 циклов по 20 с при 95°C, 20 с при 63°C, 40 с при 72°C и конечная инкубация в течение 5 мин при 72°C. Продукт реакции — ампликон 339 п.н. В ПДРФ-анализе используется рестриктаза SacI (Thermo Scientific, США). При генотипе дикого типа оба аллеля подвергаются рестрикции и образуют 2 фрагмента (195 и 143 п.н.); у гетерозигот только один аллель подвергается рестрикции, образуется три фрагмента (339, 195 и 143 п.н.); в генотипе нокаута оба аллеля теряют сайт рестрикции, поэтому образуется только один фрагмент (339 п.н.).

Раиионы

Животные содержались в клетках открытого типа и получали сбалансированный гранулированный корм (ООО Лабораторкорм, Россия). Животные экспери-

ментальных групп получали 20%-ный раствор фруктозы вместо воды. Всем животным обеспечивали доступ к пище и воде *ad libitum*.

Количество съеденного рациона и выпитой жидкости фиксировали ежедневно.

Дизайн экспериментов

Для решения поставленной цели было проведено 2 эксперимента. Эксперимент 1.

Основной задачей первого эксперимента стал общий анализ поведенческих изменений крыс нокаутной линии TAAR9-KO в сравнении с группой WT. Для этого крысы с генотипами WT и TAAR9-KO были разделены на 2 группы с равной численностью (n=6). Животным обеих групп были проведены поведенческие тесты "Открытое поле" (включая ключевые характеристики груминга), "Приподнятый крестообразный лабиринт" и "Водный лабиринт Морриса".

Эксперимент 2.

Задачей второго эксперимента явилось исследование поведенческих, биохимических и морфологических параметров крыс нокаутной линии ТААR9-КО в сравнении с группой WT, получавших 20%-ный раствор фруктозы вместо воды в течение 2-х месяцев в режиме свободного доступа. Для этого крысы, согласно генотипам, были разделены на 4 группы (n = 5-7): животные 1-й и 2-й групп — с генотипом WT, 3-й и 4-й группы — с генотипом ТААR9-КО. Крысы1-й и 3-й групп получали сбалансированный гранулированный корм, а 2-й и 4-й групп — сбалансированный гранулированный корм фруктозы вместо воды.

Животным всех групп были проведены физиологические тесты "Открытое поле", "Приподнятый крестообразный лабиринт", морфологическое исследование ткани печени и биохимическое исследование плазмы крови.

Крыс еженедельно взвешивали с точностью ± 1 г.

Сбор и хранение образцов крови.

Кровь собирали в пробирки для сбора сыворотки крови "VACUETTE" (Greiner Bio-One, Австрия), инкубировали в вертикальном положении в течение 15 мин, а затем держали при 4° С до центрифугирования. Образцы со свернувшейся кровью центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин при 4° С. Сыворотку переносили в сухие чистые пробирки и хранили до анализа при -20° С не более 5 дней.

Поведенческие эксперименты

Тест "Открытое поле" (ОП).

Уровни локомоторной активности и другие поведенческие изменения оценивали с использованием оборудования "Ореп Science" (Россия) и программного обеспечения, разработанного в Физиологическом отделе им. И.П. Павлова ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины". Уровень освещенности установки — 8300 лм. Животные помещались в центр арены на 5 мин. Регистрировали траекторию и скорость движения животного, общую и разделенную по секторам арены пройденную дистанцию. Также было посчитано количество вертикальных стоек, стоек с упором в борт арены, актов груминга, а также уровень дефекации (количество болюсов) за время тестирования.

Тест "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ).

Уровень тревожности животных оценивали с использованием оборудования "Open Science" (Россия) и программного обеспечения, разработанного в Физиологическом отделе им. И.П. Павлова ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины". Уровень освещенности установки — 8300 лм. Тест ПКЛ позволяет оценить

степень выраженности эмоциональной реакции страха и тревоги, двигательную активность, скорость ориентировочных реакций. Время пребывания животных в лабиринте составляло 5 мин. Фиксировали количество переходов из одной зоны в другую, процент посещений зон и время, проведенное в рукавах, общую неподвижность в открытых рукавах, количество свешиваний в открытых рукавах, количество заходов в открытые и закрытые рукава, количество актов груминга и дефекаций.

Тест "Водный лабиринт Морриса" (ВЛМ).

Тестирование пространственной памяти животных проводили в тесте ВЛМ. Для тестирования использовали круглый бассейн диаметром 150 и высотой 60 см, заполненный водой на высоту 43 см. Температура воды составляла 22 ± 1 °С. Квадратную платформу из оргстекла ("остров") размером 10×10 см помещали в центр одного из секторов на глубину 1-1.5 см. В качестве стартовых позиций были выбраны северо-восточная (NE), восточная (E), южная (S) и юго-западная (SW) области бассейна. В качестве пространственных ориентиров использовали визуальные стимулы — различные геометрические фигуры (крест, круг, квадрат и треугольник), расположенные на стенках бассейна в позициях NW, NE, SE и SW. Уровень освещенности установки — 8300 лм.

Четыре дня подряд животным давали по 4 попытки для поиска скрытой под водой платформы: крысу помещали в воду мордой к стенке бассейна в одной из стартовых областей бассейна. Стартовую позицию меняли в каждую из четырех попыток одного дня. Попытка заканчивалась в момент нахождения крысой платформы или через 90 с после начала попытки, если крыса не могла найти платформу. В этом случае крысу аккуратно рукой направляли к платформе. В течение 30 с животное оставляли сидеть на платформе. Новую попытку предъявляли через 90—120 с после снятия крысы с платформы в предыдущей попытке. На 5-й день эксперимента платформу убирали и всем животным давали одну попытку длительностью 90 с. Оценивали время поиска, скорость передвижения, длину пройденного пути.

Оценка показателей микроструктуры груминга

Показатели груминга анализировали визуально на основе анализа видеозаписи тестов ОП и ПКЛ в замедленном режиме. Анализ стадий груминга оценивался по следующей цефало-каудальной (от головы до хвоста) системе: отсутствие груминга (стадия 0), лизание лап (стадия 1), умывание носа и лица (стадия 2), умывание головы (стадия 3), уход за туловищем (стадия 4), чесание туловища (стадия 5), умывание задних лап и хвоста (стадия 6), умывание гениталий (стадия 7).

Были исследованы три основных показателя груминга: латентность (в с) начала груминга (LG), общее время (в с), затраченное на груминг (TS), и число актов груминга (NB) [17, 18]. Под единичным актом подразумевается одна или несколько стадий цефало-каудальной системы груминга. Перерывы длительностью более 5 с определялись как отдельные, самостоятельные акты груминга. Акт груминга считался прерванным, если хотя бы один перерыв был зафиксирован в переходах между стадиями. Также была проведена оценка числа (NIB) и процента (% IB = NIB/NB) прерванных актов груминга.

Измерение биохимических показателей

Для биохимического скрининга использовали автоматический анализатор Random Access A-25 (Biosystems S.A., Испания). Перед анализом образцы сыворотки хранили при -20° C. Были проанализированы следующие биохимические параметры: общий белок (TP), фосфор (P), глюкоза (Glu), креатинин (CRE), общий билирубин (TB), аланинаминотрансфераза (ALT), альбумин (ALB), аспартатаминотранс-

фераза (AST), коэффициент де Ритиса (AST/ALT), лактатдегидрогеназа (LDH), липаза (PL), мочевина (UREA), триглицериды (TG).

Существенно измененные параметры подтверждены на дополнительном анализаторе (Olympus AU400, Япония) для исключения методических ошибок.

Морфологический анализ печени

Морфологический анализ печени проводили с использованием стандартных гистологических методов проводки с последующим окрашиванием эозин-гематоксилином [19] и черным суданом (на общие липиды) [20]. Микрофотографии образцов ткани печени были получены с использованием светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия), оснащенным цифровой фотокамерой.

Межисследовательская повторяемость

Перед анализом образцов сыворотки и крови оборудование было обеззаражено, откалибровано и проверено внутренним контролем качества. Повторяемость результатов анализа оценивалась путем расчета коэффициента вариации (CV) 10 последовательных измерений материала внутреннего контроля качества в трех различных контролях (низком, нормальном и высоком). Коэффициенты вариации (%) рассчитывались как стандартное отклонение (SD)/среднее значение ×100.

Статистический анализ

Нормальность распределения была оценена с помощью критерия Shapiro—Wilk test (в случае $W \le 1.0$ распределение считалось ненормальным и статистический анализ проводился с использованием непараметрических критериев, описанных ниже). Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием непараметрических критериев Mann—Whitney U-test и Kruskal—Wallis H-test с помощью компьютерных программ SPSS Statistics (США) версии 16.0 и GraphPad Prism версии 6.0 от GraphPad Software (США). Полученные значения выражены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В тесте ОП было показано достоверное увеличение локомоторной активности (как горизонтальной, так и вертикальной). При этом увеличение горизонтальной локомоторной активности было на уровне тенденции. Тем не менее среднее общее количество стоек в группе КО было более чем в 4 раза выше, чем в группе WT, что указывает на увеличение исследовательской (поисковой) активности у животных экспериментальной группы (рис. 1).

Для остальных поведенческих показателей (время в центре арены, количество заходов в центр и др.) в тесте ОП не было выявлено статистически достоверных отличий между экспериментальной и контрольной группами.

В тесте ПКЛ также не было обнаружено достоверных изменений в уровнях тревожности нокаутных по ТААR9 крыс в сравнении с контрольной группой (рис. 2).

В тесте ВЛМ показано снижение средних значений времени (рис. 3) и общей пройденной дистанции (рис. 4) в группе TAAR9-КО в сравнении с "диким типом" во второй день эксперимента, что может говорить об улучшении функции краткосрочной (рабочей) памяти. Причем, отличия по времени были статистически достоверными. К 4-му дню исследования эти различия нивелировались.

На 5-й день исследования также не было зафиксировано достоверных отличий в показателях общей пройденной дистанции (659.9 \pm 128.5 и 609.6 \pm 69.0 см) и времени

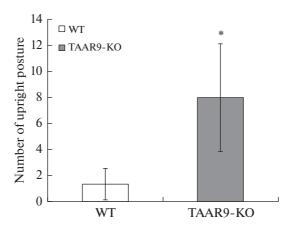


Рис. 1. Количество вертикальных стоек с упором в тесте ОП. WT — контрольная группа, ТААR9-КО — экспериментальная группа. * $p \le 0.05$ в сравнении с контрольной группой, Mann—Whitney U-test.

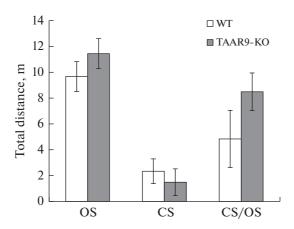


Рис. 2. Дистанция, пройденная в закрытых (OS) и открытых рукавах (CS), соотношение CS/OS в тесте ПКЛ. WT – контрольная группа, TAAR9-KO – экспериментальная группа.

 $(27.4 \pm 5.3 \text{ и } 19.6 \pm 2.7 \text{ c})$ в секторе NW (платформа) ВЛМ для групп TAAR9-KO и "дикого типа" соответственно (p > 0.05, Mann—Whitney U-test).

Традиционные показатели груминга у крыс нокаутной линии TAAR9-KO (общая продолжительность груминга и средняя продолжительность единичного акта груминга (СПЕГ)) в тесте ОП достоверно не изменились в сравнении с контрольной группой. Тем не менее, средние значения латентности груминга были снижены на уровне тенденции в группах с генотипом КО в сравнении с группами WT вне зависимости от рациона. Кроме того, анализ микроструктуры груминга показал, что крысы нокаутной линии TAAR9-KO в среднем демонстрировали большее количество стадий и число прерываний полноценных актов груминга. По остальным показателям груминга достоверных отличий обнаружено не было.

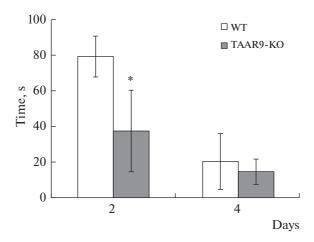


Рис. 3. Средние значения времени (в с) в тесте ВЛМ. WT — группа крыс с генотипом WT, TAAR9-KO — группа крыс с генотипом TAAR9-KO. $*p \le 0.05$ в сравнении с группой WT, Mann—Whitney U-test.

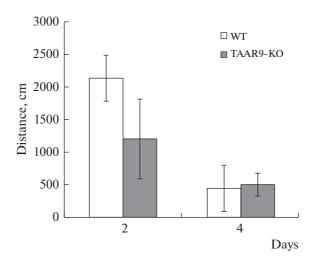


Рис. 4. Средние значения дистанций, пройденных крысами нокаутной линии TAAR9-KO в тесте ВЛМ. WT – контрольная группа крыс с генотипом WT, TAAR9-KO – группа крыс с генотипом TAAR9-KO.

В эксперименте с добавлением 20%-ного раствора фруктозы в рацион повышенный "норковый рефлекс" у крыс TAAR9-КО в тесте ОП (рис. 5) сочетался с хаотичным обследованием норок при одинаковом с контрольными животными временем заглядывания, что может быть интерпретировано как снижение концентрации внимания, вызванное функциональными нарушениями рецептора TAAR9.

Анализ интегральных показателей выявил снижение отношения относительной массы белого забрюшинного жира к бурому подлопаточному жиру в группе $KO\ K$ в сравнении с контрольной группой $WT\ K$ (рис. 6).

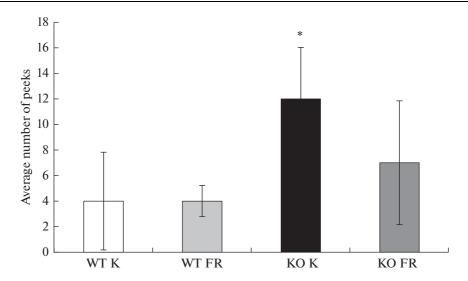


Рис. 5. Средние значения количества актов заглядывания в "норки" (норковый рефлекс) в тесте ОП. WT К — группа крыс с генотипом WT на контрольном рационе, WT FR — группа крыс с генотипом WT на рационе с добавкой 20%-ного раствора фруктозы вместо воды, КО К — группа крыс с генотипом TAAR9-КО на контрольном рационе, КО FR — группа крыс с генотипом TAAR9-КО на рационе с добавкой 20%-ного раствора фруктозы вместо воды. * $p \le 0.05$ в сравнении с контрольной группой, Kruskal—Wallis H-test ($W \le 1.0$).

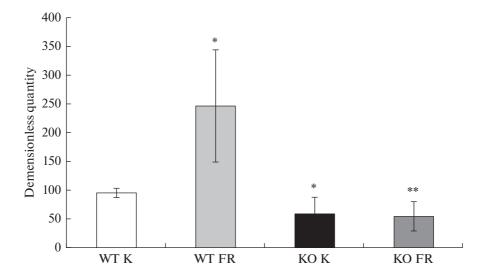


Рис. 6. Средние значения отношения относительной массы белого забрюшинного жира к бурому подлопаточному жиру для крыс ТААR9-КО. WT K — группа крыс с генотипом WT на контрольном рационе, WT FR — группа крыс с генотипом WT на рационе с добавкой 20%-ного раствора фруктозы вместо воды, КО K — группа крыс с генотипом TAAR9-КО на контрольном рационе, КО FR — группа крыс с генотипом TAAR9-КО на рационе с добавкой 20%-ного раствора фруктозы. * $p \le 0.05$ в сравнении с контрольной группой WTK, ** $p \le 0.05$ в сравнении с группой WT FR, Kruskal—Wallis H-test (W ≤ 1.0).

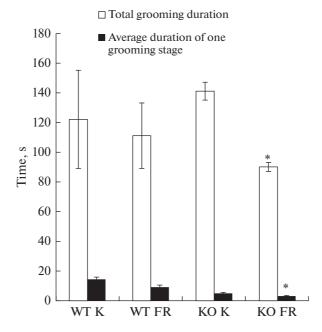


Рис. 7. Показатели микроструктуры груминга крыс TAAR9-KO: общая продолжительность и средняя продолжительность одной стадии груминга в тесте ПКЛ.

WT K — группа крыс с генотипом WT на контрольном рационе, WT FR — группа крыс с генотипом WT на рационе с добавкой 20%-ного раствора фруктозы вместо воды, КО K — группа крыс с генотипом TAAR9-KO на контрольном рационе, КО FR — группа крыс с генотипом TAAR9-KO на рационе с добавкой 20%-ного раствора фруктозы. * $p \le 0.05$ в сравнении с контрольной группой, Kruskal—Wallis H-test ($W \le 1.0$).

Добавка фруктозы к рациону приводила к достоверному увеличению отношения белой и бурой жировой ткани у крыс с генотипом WT и не влияла на этот показатель у нокаутных по гену TAAR9 животных (рис. 6).

На рис. 7 показаны изменения в микроструктуре груминга (общая продолжительность и средняя продолжительность одной стадии) крыс нокаутной линии TAAR9-KO в тесте ПКЛ на фоне потребления 20%-ного раствора фруктозы.

Из рис. 7 видно, что добавка фруктозы к рациону достоверно снижала показатели общей и средней продолжительности одной стадии груминга для группы с генотипом TAAR9-KO.

Средние значения латентности груминга были снижены на уровне тенденции в группах с генотипом КО в сравнении с группами WT вне зависимости от рациона. Кроме того, анализ микроструктуры груминга показал, что крысы нокаутной линии TAAR9-КО в среднем демонстрировали большее количество стадий и число прерываний полноценных актов груминга.

Метаболическая нагрузка фруктозой показала тенденцию к снижению концентрации общего белка у крыс TAAR9-KO в сравнении с "диким типом", что может являться следствием влияния фруктозы на нарушения белкового обмена у КО (рис. 8).

Тенденция к снижению уровня общего белка у КО на высокофруктозном рационе в сравнении как с "диким типом", так и с обоими генетическим вариантами на контрольном рационе могут говорить об увеличении скорости белкового обмена у КО под действием простых углеводов.

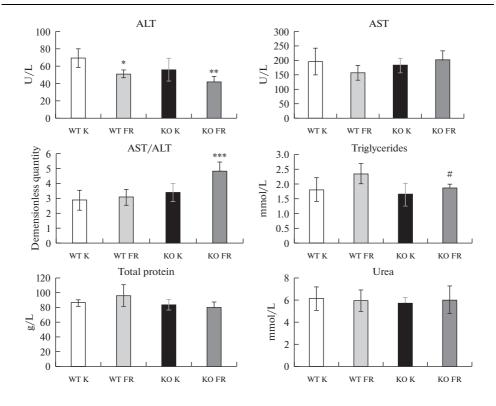


Рис. 8. Сравнительный анализ биохимических показателей крови крыс нокаутной линии ТААЯ9-КО, получавших рацион с добавкой 20%-ного раствора фруктозы вместо воды. WT K – группа крыс с генотипом WT на контрольном рационе, WT FR – группа крыс с генотипом WT на рационе с добавкой 20%-ного раствора фруктозы вместо воды, КО К – группа крыс с генотипом ТААЯ9-КО

на контрольном рационе, KO FR — группа крыс с генотипом TAAR9-KO на рационе с добавкой 20%-ного раствора фруктозы. $*p \le 0.05$ в сравнении с контрольной группой WT K, $**p \le 0.05$ в сравнении с группами WT K и WT FR, *** $p \le 0.05$ в сравнении с группами WT K, WT FR и KO K, $^{\#} - p \le 0.05$ в сравнении

с группой WT FR, Kruskal—Wallis H-test ($W \le 1.0$).

Выявлено снижение активности АЛТ в плазме крови для групп на высокофруктозном рационе обоих генотипов и повышение среднего значения коэффициента де Ритиса (ACT/AЛТ) в группе KO FR ($p \le 0.05$, рис. 8).

Количество триглицероидов в крови нокаутных по гену ТААЯ животных, получавших высокофруктозный рацион, было достоверно ниже, чем в группе с генотипом WT, получавшей 20%-ный раствор фруктозы вместо воды.

Данный факт подтверждается результатом морфологических исследований печени при качественном окрашивании на липиды черным суданом (рис. 9). В паренхиме печени животных с генотипом WT липидные вакуоли практически отсутствуют. У крыс с генотипом ТААРЗ-КО, напротив, обнаружено большое количество липидов в гепатоцитах, при этом на высокофруктозном рационе количество липидов снижается, что хорошо соотносится с современными представлениями о том, что избыток углеводов в рационе активирует образование липопротеинов низкой плотности и отток липидов из печени в другие органы и ткани. Окрашивание образцов печени эозином-гематоксилином не выявило серьезных изменений в структуре паренхимы печени (рис. 10).

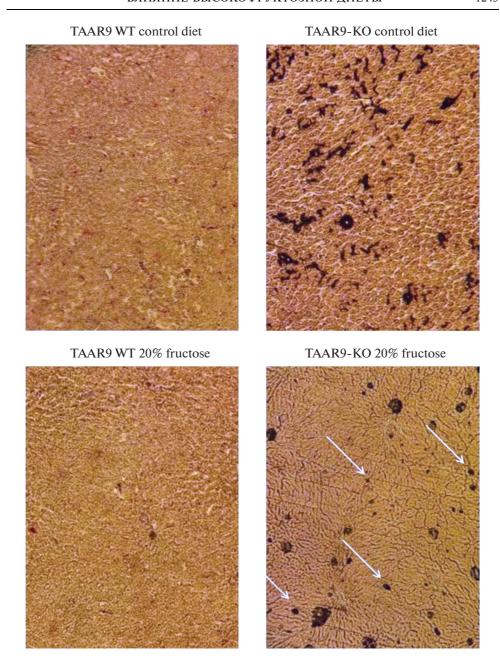


Рис. 9. Морфологическая картина ткани печени крыс нокаутной линии TAAR9-KO. Окрашивание на липиды черным суданом. Увеличение ×230.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метаболическая нагрузка фруктозой показала снижение концентрации общего белка в плазме крыс TAAR9-KO в сравнении с "диким типом", что может являться следствием увеличения скорости белкового обмена у КО под действием простых

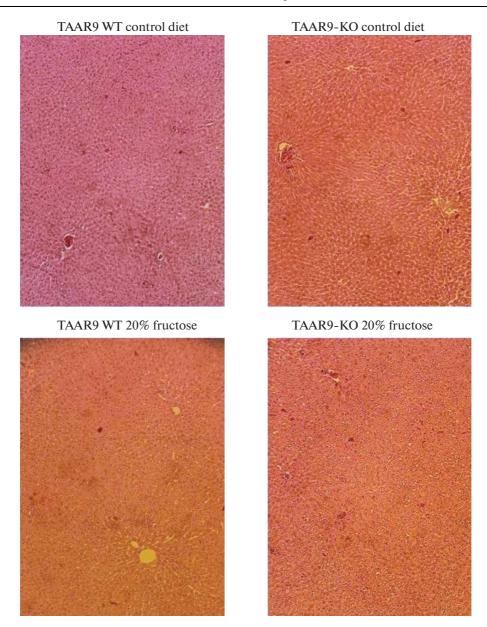


Рис. 10. Морфологическая картина ткани печени крыс нокаутной линии TAAR9-KO. Окрашивание эозином-гематоксилином. Увеличение ×230.

углеводов. Снижение активности АЛТ (маркера анаболических реакций) для исследуемых групп обоих генотипов на высокофруктозном рационе подтверждает гипотезу об ингибировании анаболических реакций (включая глюконеогенез) в сочетании с увеличением скорости расходования пула белков в плазме крови посредством избыточного содержания фруктозы в рационе.

В тесте ОП показано достоверное увеличение локомоторной активности (как горизонтальной, так и вертикальной), а также количества актов "норкового ре-

флекса" у крыс нокаутной линии TAAR9-КО в сравнении с контрольной группой. Повышенный "норковый рефлекс" крыс с генотипом КО в сочетании с хаотичным обследованием норок, по всей видимости, является маркером снижения концентрации внимания, вызванное нарушениями функции рецептора TAAR9. При этом не было обнаружено достоверных изменений в уровнях тревожности нокаутных по TAAR9 крыс в сравнении с контрольной группой.

В тесте ВЛМ выявлено снижение локомоторной активности (общей пройденной дистанции) в группе TAAR9-КО в сравнении с группой WT, что косвенно может говорить о влиянии функционального нарушения рецептора TAAR9 на дофаминовые системы.

Анализ микроструктуры груминга выявил тенденцию к повышению средних значений латентности, а также большее количество стадий и число прерываний полноценных актов груминга в группах с генотипом КО в сравнении с группами WT. Этот результат может говорить о повышении уровня тревожности крыс, однако в тесте ПКЛ отличий в уровнях тревожности между исследованными группами обнаружено не было. По всей видимости, данный эффект был связан с дефицитом внимания, признаки которого были обнаружены в других поведенческих тестах (ОП и ВЛМ).

Добавка фруктозы к рациону достоверно снижала показатели общей продолжительности груминга и средней продолжительности одной стадии груминга для группы с генотипом ТААR9-КО в тесте ПКЛ, что также может являться маркером дефицита внимания.

Таким образом, в проведенном исследовании впервые был выделен ряд поведенческих особенностей крыс нокаутной линии TAAR9-KO, в частности высокий уровень поисковой активности, выражающийся в повышенной локомоторной активности и увеличении количества актов "норкового рефлекса".

Анализ интегральных показателей вывил снижение отношения массы белого забрюшинного жира к бурому подлопаточному жиру в группе КО К в сравнении с контрольной группой WT К. Добавка фруктозы к рациону животных с генотипом WT приводила к достоверному увеличению отношения белой и бурой жировой ткани, но не влияла на этот показатель у нокаутных по гену *TAAR9* животных из группы FR KO. Таким образом, полученный результат может указывать на связь функционального нарушения рецептора TAAR9 с процессами терморегуляции.

Биохимическое исследование крови выявило ряд нарушений в липидном и белковом обмене крыс ТААR9-КО, связанном с потреблением высокофруктозного рациона, что выражалось в снижении уровня общего белка у нокаутных по гену *TAAR9* животных, снижении активности АЛТ и концентрации триглициридов в плазме крови, а также в повышении среднего значения коэффициента де Ритиса (АСТ/АЛТ) в группе КО FR, что может указывать на активизацию катаболических процессов у животных с генотипом КО под действием фруктозного рациона, являющемся следствием компенсаторного ответа организма крыс ТААR9-КО на генетически опосредованное нарушение белкового и липидного обменов.

Полученные результаты биохимического анализа крови были подтверждены данными морфологического исследования печени (окрашивание на общие липиды черным суданом).

Обнаруженные поведенческие изменения крыс нокаутной линии TAAR9-KO характеризуют возможную связь функционального нарушения рецептора следовых аминов TAAR9 с дофаминовыми системами, что, в свою очередь, приводит к повышению локомоторной активности и дефициту внимания у нокаутов и требует проведения дальнейших физиологических и биохимических экспериментов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке НИР № 0557-2019-0001 "Молекулярно-клеточные механизмы формирования нейродегенеративных процессов и поиск путей их коррекции" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Разведение и генотипирование лабораторных животных выполнено при поддержке проекта № 73022475 СПбГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАЛ АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (С.А.А.), сбор данных (С.А.А., И.С.Ж., Р.З.М., А.Л.М., Т.А.Х., А.И.Л.), обработка данных (С.А.А., И.С.Ж.), написание и редактирование манускрипта (С.А.А. В.М.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- O'Donnell MP, Fox BW, Chao P-H, Schroeder FC, Sengupta P (2020) A neurotransmitter produced by gut bacteria modulates host sensory behavior. Nature (7816): 415–420. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2395-5
- Gainetdinov RR, Hoener MC, Berry MD (2018) Trace amines and their receptors. Pharmacol Rev 70(3): 549–620. https://doi.org/10.1124/pr.117.015305
- 3. *Boulton A* (1974) Amines and theories in psychiatry. Lancet 304(7871): 52–53. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)91390-7
- 4. Ahmad W, Mohammed GI, Al-Eryani DA, Saigl ZM, Alyoubi AO, Alwael H, Bashammakh AS, O'Sullivan CK, El-Shahawi MS (2019) Biogenic amines formation mechanism and determination strategies: future challenges and limitations. Crit Rev Anal Chem 50(6): 485–50. https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1657793
- 5. *Demarest KT, Riegle GD, Moore KE* (1984) Prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: evidence for both a rapid 'tonic' and a delayed 'delayed' component. Neuroendocrinology 38: 467–475. https://doi.org/10.1159/000123935
- 6. *Khan MZ*, *Nawaz W* (2016) The emerging roles of human trace amines and human trace amine-associated receptors (hTAARs) in central nervous system. Biomed Pharmacother 83: 439–449. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.002
- Raab S, Wang H, Uhles S, Cole N, Alvarez-Sanchez R, Künnecke B, Ullmer C, Matile H, Bedoucha M, Norcross RD, Ottaway-Parker N, Perez-Tilve D, Conde Knape K, Tschöp MH, Hoener MC, Sewing S (2016) Incretin-like effects of small molecule trace amine-associated receptor 1 agonists. Mol Metab 5(1): 47–56. https://doi.org/10.1016/i.molmet.2015.09.015
- 8. Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, Durkin MM, Lakhlani PP, Bonini JA, Pathirana S, Boyle N, Pu X, Kouranova E, Lichtblau H, Ochoa FY, Branchek TA, Gerald C (2001) Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 98(16): 8966–8971. https://doi.org/10.1073/pnas.151105198
- 9. Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhan G, Quigley DI, Darland T, Suchland KL, Pasumamula S, Kennedy JL, Olson SB, Magenis RE, Amara SG, Grandy DK (2001) Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. Mol Pharmacol 60(6): 1181–1188. https://doi.org/10.1124/mol.60.6.1181
- 10. Narang D, Tomlinson S, Holt A (2011) Trace amines and their relevance to psychiatry and neurology: a brief overview. Klinik Psikofarmakol Bült 2: 73–79.
- 11. Babusyte A, Kotthoff M, Fiedler J, Krautwurst D (2013) Biogenic amines activate blood leukocytes via trace amine-associated receptors TAAR1 and TAAR2. J Leukoc Biol 93(3): 387–394. https://doi.org/10.1189/jlb.0912433
- 12. D'Andrea G, Terrazzino S, Fortin D, Farruggio A, Rinaldi L, Leon A (2003) HPLC electrochemical detection of trace amines in human plasma and platelets and expression of mRNA transcripts of trace amine receptors in circulating leukocytes. Neurosci Lett 346(1–2): 89–92. https://doi.org/10.1016/s0304-3940(03)00573-1

- 13. Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Bradaia A, Sotnikova TD, Mory R, Durkin S, Groebke Zbinden K, Norcross R, Meye CA, Metzler V, Chaboz S, Ozmen L, Trube G, Pouzet B, Bettler B, Caron MG, Wettstein JG, Hoener MC (2011) TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity. Proc Natl AcadSci U S A 108(20): 8485–8490. https://doi.org/10.1073/pnas.1103029108
- 14. *Ito J, Ito M, Nambu H, Fujikawa T, Tanaka K, Iwaasa H, Tokita S* (2009) Anatomical and histological profiling of orphan G-protein-coupled receptor expression in gastrointestinal tract of C57BL/6J mice. Cell Tissue Res 338(2): 257–269. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0859-x
- 15. Rogers RD, Everitt BJ, Baldachino A, Blackshaw AJ, Swainson R, Wynne K, Baker NB, Hunter J, Carthy T, Booker E, London M, Deakin JF, Sahakian BJ, Robbins TW (1999) Dissociable deficits in the decision-making cognition of chronic amphetamine abusers, opiate abusers, patients with focal damage to the prefrontal cortex, and tryptophan-depleted normal volunteers: evidence for monoaminergic mechanisms. Neuropsychopharmacology 20: 322–339. https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00091-8
- 16. Murtazina RZ, Zhukov IS, Korenkova OM, Popova EA, Kuvarzin SR, Efimova EV, Kubarskaya LG, Batotsyrenova EG, Zolotoverkhaya EA, Vaganova AN, Apryatin SA, Alenina NV, Gainetdinov RR (2021) Genetic Deletion of Trace-Amine Associated Receptor 9 (TAAR9) in Rats Leads to Decreased Blood Cholesterol Levels. Int J Mol Sci 2 (6): 2942. https://doi.org/10.3390/ijms22062942
- 17. Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC (2016) Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. Nat Rev Neurosci 17(1): 45–59. https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8
- Kalueff A.V., Tuohimaa P. (2005) The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. J Neurosci Methods 143(2):169-177. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.001
- Chan JKCT (2014) The Wonderful Colors of the Hematoyxlin-Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. Int J Surg Pathol. 22(1): 12-32. https://doi.org/10.1177/1066896913517939
- Nikiforov MA (ed) (2017) Oncogene-Induced Senescence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 1534: 111–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6670-7 10

Investigation of a High-Fructose Diet on Physiological, Biochemical and Morphological Parameters of TAAR9-KO Female Knockout Rats

S. A. Apryatin^{a, b, *}, I. S. Zhukov^{a, b}, A. L. Manasyan^a, R. Z. Murtazina^b, T. A. Khunagov^c, A. I. Lezina^d, and V. M. Klimenko^a

^a Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia
 ^b Insitute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg, Russia
 ^c Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
 ^d Moscow Pedagogical State University, Moscow, Russia
 *e-mail: apryatin@mail.ru

The discovery of the system of trace amines and their receptors twenty years ago gave new perspectives in the study of monoamine systems in the brain. However, of the 6 trace amine receptors found in humans, mice, and rats, only the TAAR1 receptor and its ligands are well studied. The biological functions of the remaining 5 receptors are currently unknown. In the course of this work, the results of the behavioral, biochemical and morphological parameters of TAAR9-KO rats that received a 20% fructose solution instead of water for 2 months were assessed. Physiological changes were investigated in the Open Field, Elevated Plus Maze, and Morris Water Maze behavioral tests, as well as key grooming characteristics. As a result, significant differences were revealed in the search activity, "burrow reflex", thermoregulation, changes in several of biochemical parameters and accumulation of lipids in the liver parenchyma in rats knocked out for the *TAAR9* gene.

Keywords: trace amines, behavior, fructose, TAAR9, grooming

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И АКТИВАЦИЯ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ И СЕТЧАТКЕ

© 2021 г. В. А. Кульчицкий^{1, *}, А. С. Замаро¹, Ю. Г. Шанько², В. М. Рубахова¹

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
²Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии МЗ РБ,
Минск, Республика Беларусь
*E-mail: kulchitski48@mail.ru

Поступила в редакцию 04.03.2021 г. После доработки 30.06.2021 г. Принята к публикации 06.07.2021 г.

С целью моделирования процессов апоптоза в центральной нервной системе и сетчатке глаза проведена энуклеация одного глазного яблока у крыс самцов линии Вистар (n=10) в возрасте 10-12 нед. Одновременно в одной серии опытов (n=5) ввели парабульбарно на стороне интактного глаза $100\,000$ мезенхимальных стволовых клеток (МСК), меченных РКН67, в 100 мкл буферного раствора. В другой серии опытов на крысах (n=5) непосредственно после энуклеации с одной стороны глаза осуществили интраназальное введение в верхнюю часть полости носа $100\,000$ МСК, окрашенных РКН67, в 100 мкл буферного раствора. На третьи сутки после энуклеации животных декапитировали и готовили срезы головного мозга и сетчатки глаза. Установили распределение флуоресцирующих МСК в структурах четверохолмия среднего мозга, в латеральном коленчатом теле промежуточного мозга и в сетчатке сохраненного глаза в обеих сериях опытов. Заключили, что интраназальная периневральная имплантация МСК перспективна в качестве альтернативного метода доставки МСК в сетчатку глаза пациентов с признаками дегенеративных процессов в этой структуре глаза.

Ключевые слова: сетчатка глаза, подкорковые зрительные центры, энуклеация глаза, дегенеративный процесс, стволовые клетки

DOI: 10.31857/S0869813921100058

Функционирование зрительной системы нарушается при заболеваниях, связанных с развитием дистрофических, дегенеративных и иных разрушительных процессов в сетчатой оболочке глаза в экспериментальных [1] или в естественных условиях, что является во всем мире ведущей причиной развития слепоты (caecitas) [2–4]. Микрохирургические операции по восстановлению зрения до сих пор являются недостаточно эффективными, что постоянно инициирует поиск новых методических приемов в области офтальмологии. В последние годы арсенал клиницистов и исследователей этого актуального вопроса был расширен за счет применения методик клеточной терапии. Активация нововведений в этой области инициирована разработкой Национальным нститутом здоровья США программы SCOTS (The Stem Cell Ophthalmology Treatment Study, Identifier NCT Number 01920867. SCOTS), которая является самым обширным исследованием в области применения стволовых клеток (СК) в офтальмологии, зарегистрированным Национальным институтом здоровья США [2]. Итак, клеточные технологии в микрохирургии глаза интен-

сивно развиваются, но стабильных и обнадеживающих результатов в восстановлении зрения до сих пор так и не достигнуто. Этот факт является своеобразным триггером для более интенсивного экспериментального анализа новых методик с целью последующего внедрения в офтальмологии.

Одной из базовых методик клеточных технологий является метод имплантации СК, включая по показаниям мезенхимальные СК (МСК), которые микрохирурги вводят в системный кровоток или в субтеноновое пространство, интравитреально, субретинально, субконюнктивально для активации репаративных процессов в сетчатке глаза [3, 4]. Результаты микрохирургических операций, включающих клеточные технологии, обнадеживают [3, 4], но многообразие причин и закономерностей развития патологических процессов в сетчатке глаза (ретинопатии, макулодистрофии, ангиопатии сетчатки) требует конкретизации показаний к применению и детализации эффектов СК, а также поиск более эффективных и безопасных способов применения репаративных технологий. В первую очередь речь идет о минимизации побочных эффектов при манипулировании непосредственно на глазном яблоке.

Проблема клеточных технологий в офтальмологии сравнительно новая. На сочетание "stem cell retina disease" 20 лет назад в PubMed встречались лишь единичные публикации. В современных условиях, 21 февраля 2021 г., в PubMed на сочетание "stem cell retina disease" обнаружено 1734 статьи, "cell technology retina disease" — 1442 статьи. Конкретно по тематикам среди этих статей есть 206 исследований на сочетание "subretinal stem cell retina disease", и на "stem cell technology retina disease" — 226 публикаций. Среди этих методов доминируют публикации на сочетание слов: "intravitreal method stem cell retina disease" — 93 статьи, "intravenous method stem cell retina disease" — четыре статьи, "retrobulbar stem cell retina disease" найдено пять статей; "sub-tenons stem cell retina disease" — одна статья, "parabulbar method stem cell retina disease" — отсутствуют публикации.

В рамках проекта SCOTS проводятся уникальные исследования в клиниках. К примеру [3], микрохирурги подвели итоги 32 операций с применением МСК, рекомендованные SCOTS при лечении пациентов с возрастной дегенерацией желтого пятна (Age-Related Macular Degeneration), во время которых применяли следующие способы для введения СК костного мозга: ретробульбарно, в субтеноновое пространство, внутривенно, интравитреально, субретинально. Осложнений при применении этих методов не отмечено. Авторы заключили [3], что использование клеточных технологий в сочетании с традиционной терапией возрастной дегенерации желтого пятна продемонстрировало статистически значимое улучшение остроты зрения.

Методология SCOTS изложена в тематических статьях, к примеру [2, 3]. При замене пораженной ткани в сетчатке глаза одной из основных проблем является возможность восстановления нервных связей между клетками сетчатки глаза и нейронными сетями мозга [3, 4]. Таким образом, принципиально важно начинать терапию у пациентов на ранних этапах развития процессов дегенерации в сетчатке [3, 4]. В этом отношении клеточные технологии весьма перспективны, поскольку нейротрофическая роль МСК позитивно проявляется именно на ранних этапах развития нейродегенерации [5–7]. Этот факт объясняется тем, что для выделяемых из МСК трофических факторов (nerve growth factor (NGF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived пеигоtrophic factor (BDNF), vascular endothelial growth factor (VEGF) и др.) [5–7] необходим поврежденный, но не разрушенный полностью объект воздействия в виде ганглионарных, биполярных, горизонтальных, амакриновых нейронов, радиальных глиальных клеток Мюллера, фоторецепторов. С другой стороны, вмешательство на ранней стадии развития нейродегенерации сопряжено с риском хирургических и терапевтических осложнений, когда

пациенты все еще сохраняют относительно хорошее зрение [3, 4]. В этом отношении внедрение выверенных с точки зрения эффективности и безопасности в экспериментальной и клинической практике клеточных технологий перспективно для достижения позитивного результата и минимизации побочных эффектов в микрохирургии глаза.

В связи со сказанным выше сформулирована цель экспериментальной работы, которая направлена на верификацию гипотезы о возможности миграции МСК в поврежденные участки как головного мозга, так и сетчатки глаза после имплантации МСК взрослым самцам крыс линии Вистар (3—3.5 мес.) парабульбарно (n = 5) или в подслизистый слой полости носа в области терминалей обонятельного и тройничного нервов (n = 5). При этом учитывали данные [8] о способности МСК мигрировать после интраназальной имплантации вдоль краниальных нервов (обонятельный и тройничный нервы) в область разрушенного участка мозга.

Учитывая центрипетальные и центрифугальные связи нейронов сетчатки глаза с нейронными сетями различных отделов мозга (дорсальная таламо-ретинальная, вентральная таламо-ретинальная, претекто-ретинальная, текто-ретинальная, сегменто-мезэнцефало-ретинальная, дорсальная истмо-ретинальная, вентральная истмо-ретинальная системы [9-11]), предположили, что по этим волокнам способны мигрировать эндогенные СК из мозга в сетчатку глаза или имплантированные МСК при возникновении дегенеративных процессов в сетчатке. Дополнительным подспорьем для данной точки зрения являются сведения о существовании связей между центральными элементами системы обоняния и сетчаткой глаза [11]. Такая несколько парадоксальная информация о внутрицентральных взаимосвязях нейронных сетей обоняния и зрения [11] при детальном рассмотрении является дополнительным аргументом в пользу высказанного выше предположения об эволюционно сформированной основе для миграции СК в сетчатку глаза при формировании конкретных условий, к примеру, из эндогенного пула СК в обонятельных луковицах к очагам нейродеструкции в нервной ткани [8, 12–15]. Доказано, что одним из триггеров направленной миграции МСК в поврежденные участки мозга являются разнообразные хемокины [9], к примеру, stromal-cell-derived factor 1 (SDF-1) и fractalkine [12].

В задачи работы входило моделирование на первом этапе повреждений в сетчатке глаза и в головном мозге с последующим парабульбарным или интраназальным введением МСК, меченных флуоресцентным красителем. На следующем этапе через трое суток после энуклеации животных декапитировали и готовили послойные срезы головного мозга и сетчатки глаза с целью верификации распределения МСК в головном мозге и сетчатке глаза экспериментальных животных. Ответы на цель и задачи экспериментальной работы необходимы для заключения о целесообразности или бесперспективности продолжения подобных поисковых исследований в прикладном аспекте с целью разработки альтернативных способов имплантации аутологичных МСК пациентам с возрастной дегенерацией желтого пятна.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар (n = 10) в возрасте 10-12 нед. Содержание животных в виварии Института физиологии Национальной академии наук Беларуси и экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом рекомендаций Хельсинской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 2000 г. Протокол исследований и план экспериментов одобрен Этическим комитетом Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (протокол № 41 от 13.12.2019, 518P-227). Основой для выбора дизайна исследования явилась

модель апоптоза в сетчатке и в головном мозге крыс после повреждения зрительного нерва [1].

Животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме при свободном доступе к воде и стандартному корму в клетках по 3—4 крысы. Помимо регулярного контроля массы тела крыс, дополнительное взвешивание осуществляли непосредственно перед проведением оперативного вмешательства.

Для имплантации использовали первичную культуру МСК, полученную из жировой ткани самок крыс (n = 7) массой 240–280 г по методике, утвержденной Ученым советом Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 8 от 26.08.2010 г.). В стерильных условиях жировую ткань выделяли из большого сальника и околопочечной жировой клетчатки наркотизированных (55.6 мг/кг кетамина, 5.5 мг/кг ксилазина, 1.1 мг/кг ацепромазина, внутрибрющинно) самок крыс массой 300-330 г. Полученную жировую массу помещали в пробирку, заполненную фосфатным буферным раствором (Sigma-Aldrich, США, pH 7.4). В условиях ламинарного шкафа (BioHazard, США) ткань, промытую в фосфатном буферном растворе, измельчали ножницами в чашке Петри до образования однородной массы. Ферментизацию проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C (ShellLab Series 3517, США) в течение 40 мин 0.075%-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma-Aldrich, США) или в течение 30 мин 0.25%-ным раствором трипсина-EDTA (Sigma-Aldrich, США). Объемное соотношение жировой массы и энзима 1: 1. Для нейтрализации активности энзима добавляли равный объем питательной среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко с низким содержанием глюкозы 1000 мг/л (DMEM) (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, США) и 100 мкг/мл сульфата гентамицина. Полученную суспензию клеток центрифугировали 10 мин со скоростью 1500 об./мин. Сформировавшуюся пленку из адипоцитов и супернатант удаляли. Клеточный осадок дважды отмывали в фосфатном буферном растворе в течение 10 мин при 1500 об./мин. После центрифугирования клеточный осадок ресуспензировали в полной питательной среде, содержащей питательную среду DMEM, 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл сульфата гентамицина. Высевали в пластиковые культуральные флаконы.

Через 48 ч из чашки удаляли среду, промывали культуру фосфатным буферным раствором, удаляя остатки среды и сыворотки, добавляли 1 мл раствора трипсина и инкубировали 3 мин при температуре 37°С. Затем клетки отмывали от трипсина, центрифугируя в 3—5-ти мл фосфатного буферного раствора в присутствии 10% сыворотки в течение 10 мин со скоростью 1500 об./мин. Надосадочную жидкость удаляли. Осадок ресуспензировали в полной питательной среде и высевали в культуральные флаконы.

В день проведения имплантации клеточную массу суспензировали методом ферментативной диссоциации. Для этого из флакона с клетками удаляли питательную среду, промывали фосфатным буферным раствором. Клетки инкубировали в присутствии 1-го мл трипсина при температуре 37°С в течение 3 мин. Действие фермента инактивировали добавлением равного объема полной питательной среды. Полученную суспензию клеток пипетировали, объем доводили до 5-ти мл и центрифугировали 10 мин при скорости 1500 об./мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспензировали в 5-ти мл фосфатного буферного раствора. Суспензию центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1500 об./мин. После удаления супернатанта осадок ресуспензировали в 1-ом мл раствора Diluent С и инкубировали 5 мин. Затем добавляли 5 мл фосфатного буферного раствора и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об./мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспензировали в 50-ти мкл фосфатного буферного раствора с добавлением 10-ти мкл раствора флуоресцирующего красителя РКН67 и инкубировали в темноте в течение 5 мин. Для удаления несвязанного красителя в пробирку вносили 5 мл фосфатного буферного

раствора с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки и центрифугировали 10 мин при скорости 1500 об./мин. Из образовавшегося после удаления супернатанта осадка готовили суспензию окрашенных клеток для имплантации. При исследовании образцов, окрашенных РКН67 Green Fluorescent Cell Linker, на флуоресцентном микроскопе использовали фильтры с длиной волны возбуждения 490 нм и длиной волны испускания 502 нм. Концентрация живых клеток в готовой для имплантации суспензии составляла 100000 клеток в 100 мкл фосфатного буферного раствора (подсчет осуществляли в камере Горяева).

Все операционные процедуры проводили на наркотизированных животных (55.6 мг/кг кетамина, 5.5 мг/кг ксилазина, 1.1 мг/кг ацепромазина, внутрибрюшинно). В условиях наркоза с помощью изогнутого пинцета из набора для микроопераций накладывали две лигатуры на зрительный нерв и сосуды, и после перерезки между лигатурами осуществляли энуклеацию одного глаза. Одновременно в одной серии опытов (n=5) вводили парабульбарно на стороне "интактного" глаза $100000 \, \text{MCK}$, меченных PKH67, в $100 \, \text{мкл}$ буферного раствора. В другой серии опытов на крысах (n=5) непосредственно после энуклеации с одной стороны глаза осуществляли интраназальную инъекцию в верхнюю часть полости носа $100000 \, \text{MCK}$, меченных PKH67, в $100 \, \text{мкл}$ буферного раствора. До выхода из наркоза животных размещали в отдельных клетках.

Через трое суток осуществляли декапитацию крыс с помощью гильотины (OpenScience Ltd, Россия) и изготавливали послойные горизонтальные срезы головного мозга толщиной 8 мкм и сетчатки глаза толщиной 12 мкм при температуре —19°С на криостате Microm HM525 (Microm International GmbH, Германия). Препараты непосредственно после их приготовления анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа в Институте физики им. Б.И. Степанова Национальной академии наук Беларуси (Zeiss AxioVert 200M inverted research, камера: Zeiss AxioCam HRm, объектив: Plan-Neofluar 40x/0.75, Plan-Neofluar 20x/0.75 или Plan-Neofluar 10x/0.75).

Статистический тест Колмогорова—Смирнова (тест K/S) использовали для выявления различий между гистограммами флуоресценции РКН67. Различия между гистограммами считали статистически значимыми, при p < 0.001.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В процессе анализа горизонтальных срезов мозга и сетчатки глаза принимали во внимание, что повреждение в процессе энуклеации II, III, IV и VI краниальных нервов сопровождается развитием деструктивных процессов не только в структурах мозга (верхние бугры четверохолмия среднего мозга, латеральное коленчатое тело промежуточного мозга, зрительная кора), которые являются центральными элементами зрительного анализатора, но также и в сетчатке глаза, который не был удален [9, 10]. Триггером нейродеструктивных процессов являются патологические события, которые развертываются в тканях мозга и в сетчатке глаза после нарушения целостности в первую очередь волокон зрительного нерва, проходящих в центрипетальном и центрифугальном направлениях в пересеченных краниальных нервах при проведении энуклеации глазного яблока [9–11]. Перекрест зрительных нервов является основой для развития нейродеструктивных процессов на ипси- и контралатеральной сторонах мозга после энуклеации глазного яблока [9–11]. Акцентируем внимание вновь на сведениях [9, 10] о присутствии в зрительных нервах волокон, идущих как в центрипетальном, так и в центрифугальном направлениях. Следовательно, развитие после энуклеации одного глаза нейродеструктивных процессов в подкорковых зрительных центрах головного мозга сопровождается повреждением нейронов, отростки которых обеспечивают также центрифугальный по-

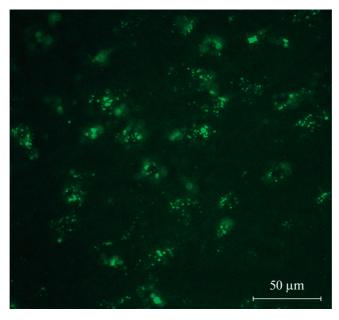


Рис. 1. Распределение флуоресцирующих меток от МСК в верхних буграх четверохолмия среднего мозга через трое суток после парабульбарного введения МСК на стороне сохраненного глаза. Шкала 50 мкм.

ток информации к сетчатке интактного глаза прооперированного животного. Итак, после энуклеации глазного яблока формируются условия для деструктивных процессов не только в подкорковых центрах головного мозга, но и в сетчатке сохраненного глаза. Доказано, что в поврежденных тканях возрастает уровень хемокинов [12] и иных слабоизученных биосубстанций, которые являются факторами [6, 12], способными активировать процессы миграции МСК в разрушенные участки мозга и в сетчатку интактного глаза.

На рис. 1 представлена флуоресценция МСК в структурах четверохолмия среднего мозга, а на рис. 2 — в латеральном коленчатом теле промежуточного мозга через три дня после парабульбарного введения МСК на стороне интактного глаза. Что является причиной данной флуоресценции? Предположительно, по сохраненным краниальным нервам интактного глаза (II, III, IV и VI) МСК мигрировали в те отделы головного мозга, в которых начали развиваться нейродеструктивные процессы после энуклеации одного глазного яблока. Дальнейшие события воспринимаются несколько невероятно, но фактом является то, что после установленной миграции МСК из парабульбарной области в участки нейродеструкции подкорковых центров зрения (рис. 1 и 2) МСК по сохраненным волокнам зрительного нерва мигрируют в обратном направлении в те участки сетчатки глаза (рис. 3), в которых развиваются деструктивные процессы после нарушения центрифугальных и центрипетальных взаимосвязей нейронов подкорковых центров зрения с сетчатой оболочкой глаза.

Важным фактом является то, что флуоресценция обнаружена помимо сетчатки "интактного" глаза только в структурах подкорковых зрительных центров головного мозга. В остальных участках головного мозга, не входящих в состав зрительного анализатора, флуоресцирующие метки от МСК не выявлены.

На рис. З представлена флуоресценция МСК в сетчатке сохраненного глаза через трое суток после парабульбарного введения МСК на стороне этого глаза.

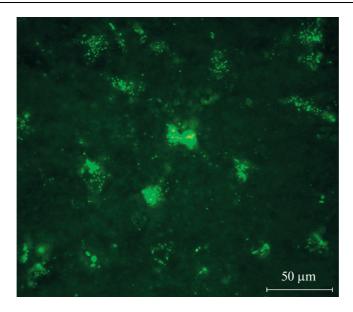


Рис. 2. Распределение флуоресцирующих меток от МСК в латеральном коленчатом теле промежуточного мозга через трое суток после парабульбарного введения МСК на стороне сохраненного глаза. Шкала 50 мкм.

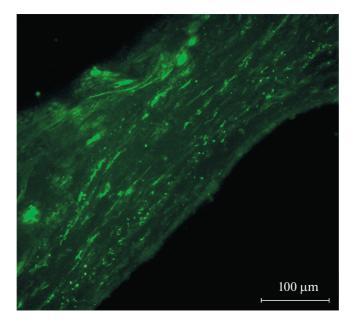


Рис. 3. Распределение флуоресцирующих меток от МСК в сетчатке сохраненного глаза через трое суток после парабульбарного введения МСК на стороне этого глаза. Шкала 100 мкм.

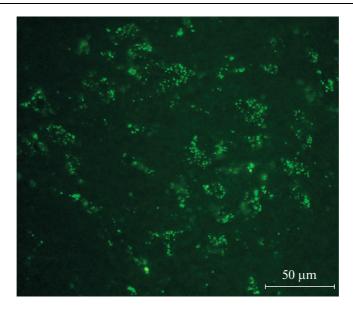


Рис. 4. Распределение флуоресцирующих меток от МСК в структурах верхних бугров четверохолмия среднего мозга через трое суток после интраназального введения МСК. Шкала 50 мкм.

Выявленная в экспериментах миграция МСК в "интактный" глаз (и в головной мозг) после парабульбарного введения СК на стороне этого глаза гипотетически может быть обусловлена иными механизмами в отличие от тех, которые предлагают авторы статьи (к примеру, по кровеносным сосудам). Авторы приняли во внимание подобные варианты событий и в серии опытов на крысах (n = 5) после энуклеации одного глаза осуществили введение МСК интраназально. Данная методика отработана в Центре мозга Института физиологии НАН Беларуси около 10-ти лет назад [8] и является альтернативой внутривенного, эндолюмбального или введения МСК непосредственно в ткань мозга после трепанации черепа по показаниям при инсультах или травмах головного мозга [8, 16-19]. Кстати, в 2018 г. утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь Инструкция по применению с использованием интраназального периневрального метода миграции МСК в поврежденную область головного мозга "Метод лечения инсульта с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани" (регистрационный номер № 242-1218), а в 2020 г. Инструкция по применению "Метод лечения черепно-мозговой травмы тяжелой степени с использованием биомедицинского клеточного продукта на основе мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани" (регистрационный номер № 140-1220). Авторы статьи являются соавторами данных инструкций, которые применены по показаниям в комплексной терапии у 92 пациентов.

На рис. 4—6 визуализируются флуоресцирующие метки от МСК как в подкорковых ядрах зрительного анализатора (рис. 4 и 5), так и в сетчатке глаза (рис. 6) после интраназальной имплантации МСК.

Итак, визуализация флуоресцирующих меток от МСК в структурах верхних бугров четверохолмия среднего мозга (рис. 4) и латеральном коленчатом теле промежуточного мозга (рис. 5) после интраназального введения МСК свидетельствует о миграции МСК из полости носа в те участки мозга, в которых в результате нейродеструкции накапливаются хемокины и иные биологические субстанции [5, 6], ко-

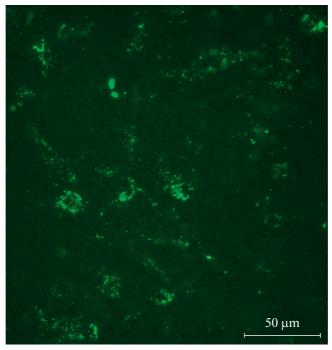


Рис. 5. Распределение флуоресцирующих меток от МСК в латеральном коленчатом теле промежуточного мозга через трое суток после интраназального введения МСК. Шкала 50 мкм.

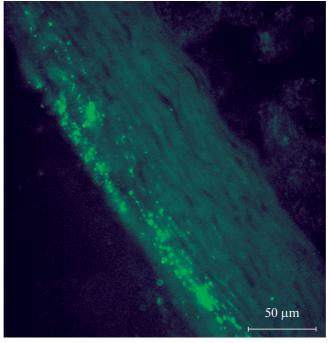


Рис. 6. Распределение флуоресцирующих меток от МСК в сетчатке сохраненного глаза через трое суток после интраназального введения МСК. Шкала 50 мкм.

торые предположительно [5, 6, 12] являются естественными стимулами для осуществления периневрального перемещения МСК из полости носа по обонятельным и тройничным нервам в область повреждения мозга.

Поскольку факты, представленные на рис. 4 и 5, свидетельствуют о реальности перемещения МСК из подслизистой оболочки полости носа в поврежденные участки головного мозга, в которых расположены нейронные сети подкорковых центров зрительного анализатора, то логично на следующем этапе экспериментов проверить гипотезу о возможности миграции МСК из этих структур мозга в поврежденные участки сетчатки сохраненного глаза после энуклеации другого глаза. И, действительно, на рис. 6 представлена флуоресценция МСК в сетчатке сохраненного глаза через трое суток после интраназального введения МСК. Выявление флуоресценции в сетчатке глаза после интраназальной имплантации МСК требует логического объяснения, что и будет предпринято на следующем этапе анализа результатов исследования.

Что является причиной миграции МСК в "интактный" глаз? Триггером для миграции МСК в сетчатку "интактного" глаза из поврежденных участков мозга являются развивающиеся деструктивные процессы в сетчатке этого глазного яблока в результате экспериментального нарушения его иннервации после энуклеации другого глазного яблока. Перекрест зрительных нервов позволяет объяснить причину развития нейродеструктивных процессов в подкорковых зрительных центрах как ипси-, так и контралатерально. Деструктивные процессы затрагивают как центрифугальные, так и центрипетальные волокна, повреждение которых сопровождается изменением структуры и функции как в мозге, так и в сетчатке глаза. Именно поэтому в эти поврежденные участки мозга и сетчатки мигрируют МСК для участия в репаративных процессах. Авторы учитывали при формулировании этих объяснений известные факты о миграции эндогенных СК мозга и МСК, введенных извне в мозг, в направлении к тем участкам поврежденной нервной ткани, в которых накапливаются ростовые факторы, цитокины [7], хемокины [12], являющиеся ориентирами для направленной миграции МСК.

Таким образом, в экспериментах на лабораторных крысах продемонстрированы элементарные методические приемы, позволяющие реализовать задачу доставки СК в поврежденные участки сетчатки глаза после имплантации МСК в области терминалей обонятельного и/или тройничного нервов в полости носа. Прикладной аспект таких методических приемов реален при условии проявления заинтересованности офтальмологов, владеющих как микрохирургическими методами, так и клеточными технологиями.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные опыты инициированы статистическими сведениями о недостаточно эффективной терапии заболеваний, сопровождающихся развитием слепоты [20—24]. В обзоре, оформленном 20 лет назад [20], обсуждались аналогичные проблемы, которые доминируют в научных статьях и в настоящее время [21, 22]. Поскольку в последние годы действуют активные программы по устранению основных причин слепоты в детстве, то естественно, что исследования причин и терапии глазных болезней начинают смещаться в сторону основных причин слепоты в пожилом возрасте [20, 25—28]. Итак, актуальная проблема решается и требует внедрения новых эффективных и безопасных методов профилактики и терапии заболеваний сетчатки глаза. С этой точки зрения перспективным направлением выглядит в офтальмологии наряду с уникальными микрохирургическими методами применение клеточных технологий.

Авторы настоящей статьи (микрохирург, нейрохирург и нейрофизиологи) попробовали ответить на один из основных вопросов в существующей проблеме применения клеточных технологий в офтальмологии и нейрохирургии. Как снизить побочные эффекты имплантации СК непосредственно в глазное яблоко (к примеру, интравитреально)? Наилучшим решением этой проблемы является поиск альтернативных способов доставки СК к поврежденной сетчатой оболочке глаза. Этот поиск проведен в экспериментах на лабораторных крысах линии Вистар. В процессе исследований выделено несколько вопросов. Во-первых, реально ли акцентировать внимание только на эволюционно зафиксированный репаративный механизм эндогенных СК мозга для активации восстановительных процессов в сетчатой оболочке глаза? Во-вторых, поскольку большинство клинических случаев демонстрирует, что этого потенциала недостаточно, то назрела необходимость поиска способов дополнительной активации репаративных процессов эндогенных СК за счет имплантации МСК не в глазное яблоко, а парабульбарно или в области терминалей иных краниальных нервов. В последнем случае реальна периневральная миграция МСК из полости носа в участки нейродеструкции мозга [8], что минимизирует возможность побочных эффектов, которые допустимы при проведении микрохирургических операций на глазном яблоке при осуществлении интравитреальных, субтеноновых инъекций пациентам. В аспекте рассматриваемой тематики примечательна публикация статьи Wolter более 50-ти лет назад [29], в которой детально проанализированы варианты центрипетальных и центрифугальных взаимоотношений элементов сетчатки и нейронных сетей подкорковых центров головного мозга с детализацией событий на уровне перекреста (хиазмы) зрительных нервов.

Постулируется, что репаративная способность МСК в поврежденных участках мозга и по аналогии в сетчатке глаза проявляется после выделения разнообразных нейротрофических факторов в очагах нейродеструкции [3, 4, 6, 17, 19, 28]. Профессионалам несложно выделить МСК из разных тканей, и МСК проявили себя многообещающими при лечении многих заболеваний путем восстановления гомеостаза органов в поврежденных или пораженных патологическими процессами тканях.

Доказано, что трофические и иммуномодулирующие свойства МСК способны защищать нейроны сетчатки и улучшать функцию клеток пигментного эпителия сетчатки от ряда заболеваний, связанных с дегенерацией сетчатки [3, 4, 19, 28]. Недавние клинические испытания выявили реальные профили безопасности для применения МСК при заболеваниях сетчатки. Однако настороженность в отношении серьезных осложнений и побочных эффектов, возникающая до сих пор из-за неудачно спланированных клинических испытаний, способны блокировать исследования в области терапии сетчатки на основе МСК. Тем не менее, результаты проведенного авторами экспериментального исследования свидетельствуют, что МСК обладают перспективным терапевтическим потенциалом для профилактики и терапии дегенеративных процессов в сетчатке глаза. Для оптимизации хирургической доставки МСК в сетчатку глаза целесообразно использовать методы, которые позволяют исключить неблагоприятные последствия. С этой точки зрения разработанный в процессе экспериментальных исследований метод интраназальной имплантации МСК с целью последующей их направленной периневральной миграции по краниальным нервам (обонятельный и тройничный нервы) в участки нейродеструкций подкорковых центров зрения и затем по зрительным нервам в сетчатку глаза является одним из вариантов для будущего анализа в клиническом аспекте с целью лечения дегенерации сетчатки.

Результаты каждого научного исследования воспринимаются на расстоянии. Авторы понимают, что получены лишь первые экспериментальные факты, которые часто подвергаются резкой критике клиницистами. Так и должно быть в научной жизни. Поводом для доли оптимизма является научная жизнь мэтра физиоло-

гии, приближающийся юбилей которого явился стимулом для оформления данной статьи. Речь идет об Александре Даниловиче Ноздрачеве, который полон новых идей и не страшится "заглядывать за горизонт", что побуждает других исследователей к непреходящему пересмотру и верификации гипотез, значимость которых определяет время.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках проекта 01.16/2 с Республиканским научно-практическим центром неврологии и нейрохирургии Министерства здравоохранения Республики Беларусь "Разработать метод лечения мозговых инсультов с применением стволовых клеток в эксперименте" в рамках задания 01.16 "Разработать и внедрить метод лечения мозговых инсультов с использованием стволовых клеток" в подпрограмме "Трансплантация клеток, тканей и органов" в рамках Государственной научно-технической программы "Новые методы оказания медицинской помощи на 2016—2020 гг." (приказ ГКНТ РБ №85 от 20.05.2016 г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования животных. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (протокол № 41 от 13.12.2019 г., Б18Р-227).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все этапы работы коллектив соавторов обсуждал совместно. Идея работы и планирование эксперимента (В.А.К. и З.А.С.), сбор данных (З.А.С., Р.В.М., В.А.К.), обработка данных (Ш.Ю.Г., З.А.С., Р.В.М), написание и редактирование манускрипта (В.А.К., Ш.Ю.Г., З.А.С.).

БЛАРОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. Токальчик Ю.П., старшему научному сотруднику лаборатории нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси, за помощь в проведении работ с клеточными культурами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Magharious MM, D'Onofrio PM, Koeberle PD (2011) Optic Nerve Transection: A Model of Adult Neuron Apoptosis in the Central Nervous System. J Vis Exp 51: 2241. https://doi.org/10.3791/2241
- 2. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng CY, Wong TY (2014) Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Health 2: 106–116. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1
- 3. Weiss JN, Levy S (2020) Stem Cell Ophthalmology Treatment Study (SCOTS): Bone Marrow-Derived Stem Cells in the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. Medicines (Basel) 7(4): 16.
 - https://doi.org/10.3390/medicines7040016
- Akyol E, Lotery A (2020) Gene, Cell and Antibody-Based Therapies for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. Biologics 14: 83

 –94. https://doi.org/10.2147/BTT.S252581
- Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR (1998) Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. Proc Natl Acad Sci USA 95: 10235–10239. https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10235

- 6. Wagenaar N, de Theije C, de Vries L, Groenendaal F, Benders MJNL, Nijboer CHA (2018) Promoting neuroregeneration after perinatal arterial ischemic stroke: neurotrophic factors and mesenchymal stem cells. Pediatr Res 83: 372–384. https://doi.org/10.1038/pr.2017.243
- 7. Shao A, Tu S, Lu J, Zhang J (2019) Crosstalk between stem cell and spinal cord injury: pathophysiology and treatment strategies. Stem Cell Res Ther 10(1): 238. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1357-z
- 8. Kulchitsky VA, Shanko YG, Molchanov PG, Cherehkevich SN, Chotianovich MO, Denisov AA, Pashkevich SG, Strizhak IV, Andrievskaya MV, Rodich AV, Pitlik TN, Bulay PM (2012) The direction of stem cells movement into the brain depends on the areas of their injection into peripheral parts of the nervous system. Biological Motility: Fundamental and Applied Science. Pushchino: Foton-Vek: 99–101. https://docplayer.net/129455540-Biological-motility-fundamental-and-applied-science.html
- 9. Davis BM, Crawley L, Pahlitzsch M, Javaid F, Cordeiro MF (2016) Glaucoma: the retina and beyond. Acta Neuropathol 132(6): 807–826. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1609-2
- Repérant J, Médina M, Ward R, Miceli D, Kenigfest NB, Rio JP, Vesselkin NP (2007) The evolution of the centrifugal visual system of vertebrates. A cladistic analysis and new hypotheses. Brain Res Rev 53(1): 161–197. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.004
- 11. Behrens U, Wagner H-J (2004) Terminal nerve and vision. Microsc Res Tech 65(1–2): 25–32. https://doi.org/10.1002/jemt.20108
- 12. *Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SSW* (2004) Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. Stem Cells 22(3): 415–427. https://doi.org/10.1634/stemcells.22-3-415
- 13. *Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K* (2017) Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. J Neurochem 141(6): 835–847. https://doi.org/10.1111/jnc.14002
- Hayashi Y, Jinnou H, Sawamoto K, Hitoshi S (2018) Adult neurogenesis and its role in brain injury and psychiatric diseases. J Neurochem 147(5): 584–594. https://doi.org/10.1111/jnc.14557
- 15. Li Q, Siri T, Bressan C, de Koninck Y, Saghatelyan A (2020) Developmental Potential and Plasticity of Olfactory Epithelium Stem Cells Revealed by Heterotopic Grafting in the Adult Brain. Stem Cell Reports 14(4): 692–702. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.03.008
- 16. Ferri ALM, Bersano A, Lisini D, Boncoraglio G, Frigerio S, Parati E (2016) Mesenchymal Stem Cells for Ischemic Stroke: Progress and Possibilities. Curr Med Chem 23(16): 1598–1608. https://doi.org/10.2174/0929867323666160222113702
- 17. Detante O, Rome C, Papassin J (2017) How to use stem cells for repair in stroke patients. Rev Neurol (Paris) 173(9): 572–576. https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.09.003
- Levy ML, Crawford JR, Dib N, Verkh L, Tankovich N, Cramer SC (2019) Phase I/II Study of Safety and Preliminary Efficacy of Intravenous Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Chronic Stroke. Stroke 50(10): 2835–2841. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.026318
- Mead B, Berry M, Logan A, Scott RA, Leadbeater W, Scheven BA (2015) Stem cell treatment of degenerative eye disease. Stem Cell Res 14(3): 243257. https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.02.003
- West SK (2000) Looking forward to 20/20: a focus on the epidemiology of eye diseases. Epidemiol Rev 22(1): 64–70. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018025
- Camelo S, Latil M, Veillet S, Dilda PJ, Lafont R (2020) Beyond AREDS Formulations, What Is Next for Intermediate Age-Related Macular Degeneration (iAMD) Treatment? Potential Benefits of Antioxidant and Anti-inflammatory Apocarotenoids as Neuroprotectors. Oxid Med Cell Longev 2020: 4984927. https://doi.org/10.1155/2020/4984927
- 22. Li HY, Ruan YW, Ren CR, Cui Q, So KF (2014) Mechanisms of secondary degeneration after partial optic nerve transection. Neural Regen Res 9(6): 565–574. https://doi.org/10.4103/1673-5374.130093
- Guedes ME, Almeida AC, Patricio MS, Costa JM (2011) Acquired retrograde transsynaptic degeneration. BMJ Case Rep 2011:bcr0820114653. https://doi.org/10.1136/bcr.08.2011.4653
- 24. Gennarelli TA, Thibault LE, Tipperman R, Tomei G, Sergot R, Brown M, Maxwell WL, Graham DI, Adams JH, Irvine A, Gennarelli LM, Duhaime AC, Boock R, Greenberg J (1989) Axonal injury in the

- optic nerve: a model simulating diffuse axonal injury in the brain. J Neurosurg 71(2): 244-253. https://doi.org/10.3171/jns.1989.71.2.0244
- 25. Weishaupt JH, Bahr M (2001) Degeneration of axotomized retinal ganglion cells as a model for neuronal apoptosis in the central nervous system molecular death and survival pathways. Restor Neurol Neurosci 19(1–2): 19–27. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12082226/
- 26. Gokoffski KK, Peng M, Alas B, Lam P (2020) Neuro-protection and neuro-regeneration of the optic nerve: recent advances and future directions. Curr Opin Neurol 33(1): 93–105. https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000777
- 27. Savvaki M, Kafetzis G, Kaplanis S-I, Ktena N, Theodorakis K, Karagogeos D (2021) Neuronal, but not glial Contactin 2, negatively regulates axon regeneration in the injured adult optic nerve. Eur J Neurosci 53(6): 1705–1721. https://doi.org/10.1111/ejn.15121
- 28. Silva-Junior AJ, Mesentier-Louro LA, Nascimento-Dos-Santos G, Teixeira-Pinheiro LC, Vasquez JF, Chimeli-Ormonde L, Bodart-Santos V, Carvalho LRP, Santiago MF, Mendez-Otero R (2021) Human mesenchymal stem cell therapy promotes retinal ganglion cell survival and target reconnection after optic nerve crush in adult rats. Stem Cell Res Ther 12(1): 69. https://doi.org/10.1186/s13287-020-02130-7
- Wolter JR (1965) The centrifugal nerves in the human optic tract, chiasm, optic nerve, and retina. Trans Am Ophthalmol Soc 63: 678–707. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1310211/pdf/taos00036-0690.pdf

Mesenchymal Stem Cells and Activation of Reparative Processes in Brain and Retina

V. A. Kulchitsky^{a, *}, A. S. Zamaro^a, Y. G. Shanko^b, and V. M. Rubakhova^a

^a Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus
^b Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Belarus
*e-mail: kulchitski48@mail.ru

In order to simulate the processes of apoptosis in the central nervous system and retina we performed enucleation of one eyeball in male Wistar rats (n=10) at the age of 10-12 weeks. Simultaneously in one series of experiments (n=5) 100000 PKH67-labeled mesenchymal stem cells (MSCs) were parabulbar injected on the intact eye side in $100~\mu$ l of buffer solution. In another series of experiments in rats (n=5) immediately after enucleation on one side of the eye 100~000 PKH67-labeled mesenchymal stem cells (MSCs) in $100~\mu$ l of buffer solution were injected intranasally into the upper part of the nasal cavity. Three days after enucleation, brain and retinal slices were prepared. Distribution of fluorescent MSCs was established in both series of experiments in the next structures: quadruple of mesencephalon, lateral geniculate body of diencephalon and the retina of preserved eye. It was suggested that intranasal perineural implantation of MSCs, due to its simplicity and efficiency, is promising as an alternative method of MSCs delivery into the retina of patients with signs of dystrophic and degenerative processes.

Keywords: retina, subcortical visual centers, eye enucleating, degenerative process, stem cells

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

РЕАКЦИИ НЕЙРОНОВ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ НА СТИМУЛЯЦИЮ ОБЛАСТИ ВИБРИСС У КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij, ГЕНЕТИЧЕСКИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К АБСАНС-ЭПИЛЕПСИИ

© 2021 г. Д. А. Цветаева¹, В. В. Раевский^{1, *}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия *E-mail: vraevsky@mail.ru

Поступила в редакцию 11.03.2021 г. После доработки 05.05.2021 г. Принята к публикации 06.05.2021 г.

У крыс линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс-эпилепсии (АЭ) и демонстрирующих депрессивно-подобное поведение, исследовали особенность функционирования соматосенсорной системы в периоды, когда АЭ еще не сформирована (2-3 мес.) и когда патология хорошо выражена (6-7 мес.). Контрольными животными являлись здоровые крысы линии Wistar, у которых регистрировали внеклеточные ответы одиночных нейронов соматосенсорной коры на одиночное электрическое раздражение области вибрисс. Установлено, что вызванная активность нейронов соматосенсорной коры на афферентную стимуляцию, вне зависимости от возраста и вида животных, включает четыре компонента: первичные (коротко-латентные) возбуждение и торможение, и вторичные (длинно-латентные) возбуждение и торможение. У крыс WAG/Rij, в отличие от здоровых крыс Wistar, в 2-3-месячном возрасте число коротко-латентных тормозных реакций значимо меньше, а число длинно-латентных тормозных реакций значимо больше. Постулируется, что нарушение баланса тормозных механизмов разной природы может обусловливать развитие как АЭ, так и депрессии у крыс линии WAG/Rij. У 6—7-месячных крыс линии WAG/Rij (в период, когда эпилептическая активность сформирована) обнаружено, что вторичная активационная реакция на афферентное раздражение представлена преимущественно многокомпонентной высокочастотной фазной реакцией (чередование коротких по продолжительности разрядов нейрона и тормозных периодов). У крыс линии Wistar в этот возрастной период вторичное возбуждение представлено тонической реакцией. Частота фазных разрядов сопоставима с частотой пик-волновой активности, являющейся электроэнцефалографическим признаком АЭ. Предполагается, что фазную реакцию можно рассматривать как нейронный эквивалент эпилептической активности, и пик-волновая активность у крыс WAG/Rij может быть провоцирована афферентацией от вибрисс.

Ключевые слова: нейрон, соматосенсорная кора, вибриссы, абсанс-эпилепсия, крысы линии WAG/Rij

DOI: 10.31857/S0869813921100101

ВВЕДЕНИЕ

Крысы линии WAG/Rij генетически предрасположены к абсанс-эпилепсии (АЭ) [1] и демонстрируют депрессивно-подобное поведение [2]. Электроэнцефалографическим проявлением эпилептического приступа является генерализованная пик-

волновая активность (Spike-wave discharges), которая формируется у этих животных в 5-6-месячном возрасте [3]. Эпилептический приступ продолжается в течение нескольких секунд, а частота пик-волновых разрядов у крыс WAG/Rij уменьшается от начала приступа до его окончания с 15 до 6—7 Гц [4]. Существенная роль в формировании АЭ принадлежит сенсорным факторам. Было установлено, что ограничение видоспецифической афферентации за счет выстригания вибрисс в течение первых трех недель жизни крысенка провоцирует более раннее развитие АЭ [5]. В противоположность этому, ежедневная дополнительная тактильная стимуляция крысят линии WAG/Rij в течение первых 20-ти дней жизни препятствует развитию как АЭ, так и депрессивно-подобного поведения в 6-месячном возрасте у этих животных [6]. На формирование АЭ могут оказывать влияние и видоспецифические сенсорные факторы раннего онтогенеза. В экспериментах с перекрестным воспитанием новорожденных крысят показано, что замена самок WAG/Rij, генетически предрасположенных к АЭ, здоровыми самками линии Wistar в период молочного вскармливания замедляет развитие патологии [7]. Установлено, что данная процедура оказывает влияние и на проявление депрессии у этих животных [8].

Особая роль в возникновении эпилептического приступа отводится соматосенсорной коре. Предполагается, что она является триггерной зоной генерации пикволновой активности [9]. Сформированный в этой области первичный разряд распространяется кортикофугально, активируя таламические ядра [10].

Относительно недавно появились сведения о том, что заднее ядро таламуса (PO) может выполнять функцию ревербератора, обеспечивая циркуляцию возбуждения между неокортексом и таламусом [11]. Нами установлено, что электрическая стимуляция PO вызывает в сенсомоторной коре у 6-месячных крыс WAG/Rij фазную реакцию (чередование коротких по продолжительности разрядов нейрона и тормозных периодов), которую было предложено рассматривать в качестве нейронного эквивалента пик-волновой активности [12]. В связи с тем, что PO опосредует паралемнисковый вход в соматосенсорную кору от вибрисс, допустимо предположить, что афферентация из области вибрисс способна инициировать эпилептический приступ у крыс линии WAG/Rij.

Таким образом, результаты исследования роли соматической афферентации в формировании АЭ свидетельствуют в пользу наличия функциональных особенностей соматосенсорного анализатора у крыс WAG/Rij, которые обусловливают как раннее развитие депрессии, так и формирование эпилептического статуса.

Задачей настоящего исследования было выявление специфики реакций одиночных нейронов соматосенсорной зоны коры на стимуляцию области вибрисс у крыс линии WAG/Rij 2—3-месячного возраста, когда АЭ еще не сформирована и 6—7-месячного возраста, когда АЭ хорошо выражена.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали самцов крыс линии Wistar и линии WAG/Rij (собственное разведение). Все эксперименты выполняли в соответствии с протоколом использования лабораторных животных Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, основанного на директиве Совета Европейского Сообщества (86/609/EEC).

В остром опыте под уретановым наркозом (0.15 г на 100 г массы тела животного) с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2 М раствором NaCl (диаметр кончика ≤1 мкм) регистрировали внеклеточную активность одиночных нейронов. Регистрирующий электрод ориентировали по координатам AP +2.5; L 5.5 и погружали вертикально. В этом случае он входил в соматосенсорную кору тангенциально под углом 45°. Ориентируясь на морфометрические исследования [13], было рассчитано, что IV слой коры в этом случае занимает пространство на глуби-

не от 550 до 1400 мкм. Регистрацию активности нейронов осуществляли в этом диапазоне.

Как было отмечено, основанием данного исследования, в том числе, были полученные нами данные о возникновении в соматосенсорной коре фазной реакции на электрическую стимуляцию РО и высказанное нами предположение, что афферентация из области вибрисс способна инициировать приступ эпилепсии. В связи с тем, что при стимуляции РО активируются множественные афферентные входы в кору, мы сочли целесообразным использовать в настоящем исследовании не механическую стимуляцию отдельных вибрисс, позволяющую анализировать рецептивные поля сенсорных нейронов, а электрическое раздражение этой области, полагая, что результаты стимуляции множественных входов из области вибрисс более сопоставимо с результатами, полученными при электрическом раздражении РО.

Для стимуляции области вибрисс использовали игольчатые электроды с межэлектродным расстоянием 4 мм, которые вводили вдоль ряда С вибрисс. Стимуляцию осуществляли одиночным прямоугольным импульсом тока силой 0.5 мкА, длительностью 0.2 мс, что, как правило, в 2 раза превышало силу раздражения, вызывающую минимальное подергивание вибрисс.

Импульсную активность нейрона регистрировали в течение 4 с: 2 с до и 2 с после стимула. Результаты сохраняли в памяти компьютера. Для анализа реакций по результатам 10 раздражений строили перистимульные гистограммы с разрешением бина от 1 до 16 мс. Анализ осуществляли с помощью компьютерной программы, созданной по нашему заказу фирмой L-Card. На основе сравнения средней частоты потенциалов действия в фоне и после раздражения программа выделяла предполагаемые зоны реакции (возбуждение/торможение) по критерию 30%-ного увеличения или уменьшения средней частоты разрядов. После установления значимого отличия частоты потенциалов действия в предполагаемой зоне реакции по сравнению с фоном (использовали непараметрический критерий Вилкоксона) вычисляли латентный период (от момента нанесения раздражения до начала зоны реакции), продолжительность реакции и частоту потенциалов действия в зоне реакции.

Статистическую значимость межгрупповых различий определяли с использованием параметрического *t*-теста (все анализируемые показатели имели нормальное распределение — тест Шапиро—Уилка) и теста двух пропорций (two-sided).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 2—3-месячных крыс линии Wistar

В экспериментах на 6 крысах линии Wistar зарегистрированы 48 нейронов. Из них 37 нейронов реагировали на одиночную электрическую стимуляцию области вибрисс. Реакция состояла из нескольких активационных и тормозных компонентов. По критериям латентного периода и длительности реакции нами выделено 4 компонента ответа на стимуляцию области вибрисс: первичное возбуждение (1 E), первичное торможение (1 I), вторичное возбуждение (2 E) и вторичное торможение (2 I) (рис. 1a). Латентный период первичного возбуждения составлял 27.8 ± 8.3 мс, а продолжительность 51.5 ± 44 мс. Латентный период вторичного возбуждения был 209.3 ± 67.5 мс а продолжительность 313 ± 224.7 мс. По обоим показателям первичный и вторичный ответ значимо отличались (t(13.1) - 45, p < 0.001; t(5.6) - 45, p < 0.001 соответственно). Первичное торможение возникало с латентным периодом 70.6 ± 23.4 мс, а латентный период вторичного торможения составлял 697.5 ± 146 мс. Отличия были значимы (t(15.3) - 26, p < 0.001).

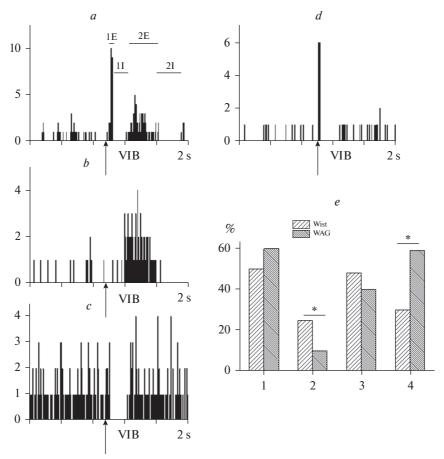


Рис. 1. Реакция нейронов соматосенсорной зоны коры на стимуляцию области вибрисс у 2-3-месячных крыс Wistar. Суммарные перистимульные гистограммы (10 предъявлений). Эпоха анализа 2c. 1 бин -8 мс. По оси ординат - количество спайков в бине. Стрелка - момент нанесения раздражения. a- сложный ответ, включающий первичные возбуждение 1E и торможение 1I, вторичные возбуждение 2E и торможение 2I; b- вторичное возбуждение; c- первичное торможение; d- первичные возбуждение и торможение; e- соотношение активационных и тормозных компонентов ответа на стимуляцию области вибрисс у крыс Wistar и WAG/Rij; 1- первичное возбуждение, 2- первичное торможение, 3- вторичное возбуждение, 4- вторичное торможение. *p < 0.05 по критерию двух пропорций (two-sided).

В ряде случаев реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс состояла из отдельных компонентов (рис. 1b-d). В связи с этим частота встречаемости перечисленных активационных и тормозных реакций была разной. Первичное возбуждение выявлено у половины всех зарегистрированных нейронов. Первичное торможение обнаружено у 25% нервных клеток. Вторичное возбуждение выявили у 48%, а вторичное торможение у 30% нейронов соматосенсорной коры (рис. 1e).

Реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 2—3-месячных крыс линии WAG/Rij

В этой серии экспериментов у 8 крыс WAG/Rij зарегистрировали 58 нейронов соматосенсорной коры. Из них 49 нейронов реагировали на одиночную электриче-

11 111 10/	n wito/rej							
	Возбуждение 1. Лат.	Возбуждение 1 Длит.	Торможение 1. Лат.	Торможение 1. Длит.	Возбуждение 2. Лат.	Возбуждение 2. Длит.	Торможение 2. Лат.	Торможение 2. Длит.
Wistar	27.8 ± 8.3 $n = 24$ 24 $(24-28)$	51.5 ± 44 $n = 24$ 40 $(24-48)$	70.6 ± 23.4 $n = 13$ 64 $(48-56)$	$ \begin{array}{c} 136.4 \pm 40.7 \\ n = 13 \\ 136.4 \\ (112-176) \end{array} $	209.3 ± 67.5 $n = 23$ 200 $(164-240)$	$ 313 \pm 224.7 \\ n = 23 \\ 272 \\ (144-370) $	697.5 ± 146 $n = 15$ 640 $(592 - 840)$	327.7 ± 271.7 $n = 15$ 232 $(160-312)$
WAG/Rij	$24.7 \pm 3.0* n = 35 24 (24-24)$	51.1 ± 26 n = 35 48 (37-72)	52 ± 8.4 n = 6 52 (48-56)	$ \begin{array}{c} 110.6 \pm 24.5 \\ n = 6 \\ 108 \\ (56-120) \end{array} $	$ \begin{array}{c} 180.8 \pm 44.2 \\ n = 23 \\ 160 \\ (144 - 208) \end{array} $	302.8 ± 240.2 $n = 23$ 192 $(112-416)$	531.1 ± 173 n = 34* 504 (400-660)	307.8 ± 174.4 $n = 34$ 272 $(208-352)$

Таблица 1. Временные параметры реакций нейронов соматосенсорной коры в мс (латентные периоды и длительность) на стимуляцию области вибрисс у 2—3-месячных крыс линий Wistar и WAG/Rij

 $M\pm m, n$ — число реакций, ниже медиана и в скобках нижний и верхний квартили, *p < 0.05 по t-критерию.

скую стимуляцию области вибрисс. Компонентный состав реакций нейронов у крыс линии WAG/Rij не отличался от обнаруженного у крыс Wistar. Временные параметры ответов в основном не различались. Отличия были выявлены только для латентных периодов первичного возбуждения и вторичного торможения. У крыс линии WAG/Rij эти параметры были значимо меньше, чем у крыс линии Wistar (табл. 1).

Существенные отличия реакций нейронов соматосенсорной коры на афферентную стимуляцию у крыс линии WAG/Rij были обнаружены по критерию встречаемости тормозных компонентов ответа. Число нейронов, реагирующих первичной тормозной реакцией у крыс линии WAG/Rij было значимо меньше (p=0.04 по тесту двух пропорций — two-sided). (рис. 1e, 2). В отличие от первичного торможения вторичное торможение у крыс линии WAG/Rij зарегистрировано у большего числа нейронов соматосенсорной коры (59% у WAG/Rij, 30% у Wistar) (рис. 1e, 4). Различие значимо — p=0.03 по тесту двух пропорций (two-sided).

Реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 6—7-месячных крыс линии Wistar

У 6-ти крыс линии Wistar зарегистрирована активность 52-х нейронов соматосенсорной коры, из которых 49 нейронов реагировали на одиночную электрическую стимуляцию области вибрисс. Как правило, реакция была сложной: включала активационные и тормозные компоненты и в целом была схожей с выявленной нами у крыс линии Wistar более раннего возраста. Наиболее существенное отличие заключалось в том, что у части нейронов вторичный активационный компонент мог быть представлен не только тоническим разрядом (рис. 2a), но и двумя более короткими по продолжительности фазами, а у 4-х нейронов был обнаружен 3-компонентный ответ (рис. 2b).

Реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 6—7-месячных крыс линии WAG/Rij

У 6-ти крыс линии WAG/Rij в возрасте, когда АЭ уже хорошо выражена, исследована реакция 51-ного нейрона соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс. В этой серии экспериментов 46 нейронов реагировали на афферентную стимуляцию. Компонентный состав реакций был таким же, как и у крыс Wistar.

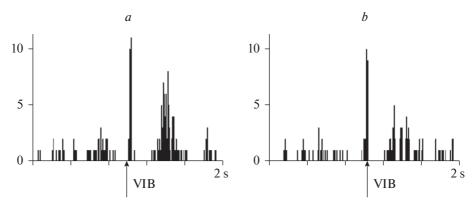


Рис. 2. Реакции нейронов соматосенсорной зоны коры на стимуляцию области вибрисс у 6—7-месячных крыс Wistar: a — сложный ответ, включающий вторичное тоническое возбуждение; b — сложный ответ, включающий вторичную фазную активацию.

Суммарные перистимульные гистограммы (10 предъявлений). Эпоха анализа -2 с; 1 бин -8 мс. По оси ординат - количество спайков в бине. Стрелка - момент нанесения раздражения.

Наиболее выраженное отличие реакции у крыс линии WAG/Rij заключается в появлении многокомпонентной фазной реакции (рис. 3а), которая представлена серией из 6-8 коротких по продолжительности (56.0 ± 20.7 мс) высокочастотных разрядов нейрона и тормозных пауз, а также в уменьшении числа вторичных активационных тонических реакций (рис. 3b, 3). Период генерации этих разрядов составлял 79.7 ± 16.7 мс. Как было отмечено в предыдущем разделе работы, у крыс линии Wistar также были обнаружены фазные реакции нейронов коры на стимуляцию вибрисс. Однако они по целому ряду показателей отличаются от фазных реакций, зарегистрированных у крыс WAG/Rij. Во-первых, фазные реакции у крыс линии Wistar обнаружены только у 4-х нейронов, в то время как фазный ответ у крыс линии WAG/Rij был характерен для 33% нервных клеток (рис. 3b, 4). Вовторых, частота потенциалов действия в фазном разряде у WAG/Rij значимо больше (t(9.4) - 28, p < 0.001) (рис. 3c). В-третьих, фазный ответ у крыс Wistar представлен максимум тремя разрядами, в то время как у крыс WAG/Rij количество разрядов может достигать восьми. В результате общая продолжительность вторичного компонента реакции у крыс WAG/Rij (366.1 \pm 95 мс) значимо превышает длительность вторичного возбуждения у крыс Wistar (t(3.6) - 53, p < 0.001) (табл. 2).

Изменение структуры вызванной реакции сопровождается изменением временных параметров компонентов ответа (табл. 2).

Обращает на себя внимание меньший латентный период первичного торможения и вторичного возбуждения и меньшая продолжительность активационных ответов у крыс WAG/Rij. Больший латентный период вторичного торможения у крыс линии WAG/Rij является, по-видимому, следствием большей продолжительности вторичного возбуждения у крыс WAG/Rij по сравнению со вторичным возбуждением у крыс Wistar.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование реакции нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию вибрисс у крыс линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к АЭ, и у здоровых животных линии Wistar позволило установить, что одиночное афферентное раздражение вызывает сложную реакцию нейронов коры у этих животных. Она пред-

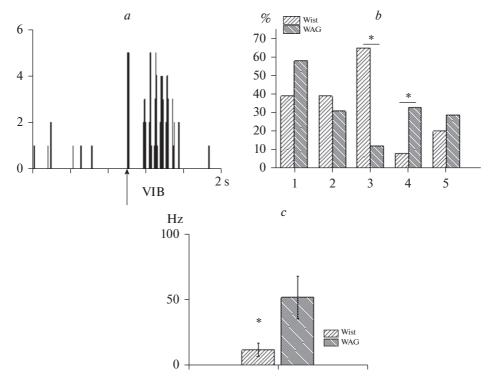


Рис. 3. Особенности реакций нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 6—7-месячных крыс WAG/Rij.

a- фазная реакция нейрона у крысы линии WAG/Rij (Суммарная перистимульная гистограмма, 10 предъявлений). Эпоха анализа -2 с; 1 бин -8 мс. По оси ординат количество спайков в бине. Стрел-ка — момент нанесения раздражения.

b — соотношение активационных и тормозных компонентов ответа нейронов соматосенсорной коры у крыс линии Wistar (Wist) и WAG/Rij (WAG). 1 — первичное возбуждение, 2 — первичное торможение, 3 — вторичная тоническое возбуждение, 4 — вторичная фазная активация, 5 — вторичное торможение; *p < 0.05 по критерию двух пропорций (two-sided).

c — сравнительный анализ частоты потенциалов действия в фазном компоненте ответа у крыс Wistar и WAG/Rij (по оси ординат частота в Γ ц); *p < 0.001 по t-критерию.

ставлена коротко- и длинно-латентными активационными и тормозными ответами. Вероятнее всего, каждый компонент ответа отражает вовлечение разных структур в реакцию на сенсорный стимул. Если первичное возбуждение и торможение можно рассматривать как реакцию на короткий электрический стимул, то вторичные

Таблица 2. Временные параметры реакций нейронов соматосенсорной коры (мс) на стимуляцию области вибрисс у 6—7-месячных крыс линий Wistar и WAG/Rij

	Возбуждение 1 Длит	Торможение 1 Лат	Возбуждение 2 Лат	Возбуждение 2 Длит	Торможение 2. Лат
Wistar	$ \begin{array}{c} 189 \pm 79.5 \\ n = 20 \\ 168 (144-208) \end{array} $	68.6 ± 27.6 $n = 20$ $60 (52-76)$	252.2 ± 67.5 $n = 37$ $232 (208-304)$	$ 228.7 \pm 144.9 n = 37 184 (128-320) $	623.2 ± 109.6 $n = 10$ $592 (536-728)$
WAG/Rij	$37 \pm 21.4 *$ $n = 31$ $32 (16-56)$	$43.2 \pm 21.1 *$ n = 15 32 (32-64)	$ \begin{array}{c} 192 \pm 67 * \\ n = 23 \\ 192 (152-268) \end{array} $	$366.1 \pm 95*$ n = 18 351 (280-424)	$740.8 \pm 121.8 *$ $n = 15$ $736 (664-848)$

 $M\pm m, n$ — число реакций, ниже медиана и в скобках нижний и верхний квартили, *p < 0.05 по t-критерию.

длинно-латентные компоненты ответа, вероятнее всего, являются следствием вовлечения некой внутрикорковой системной организации нейронов, принимающих участие в анализе сенсорной информации или реакции нейронов на афферентное возбуждение, опосредованное ростральным и каудальным ретикулярными ядрами [10].

Первичное возбуждение оказалось наиболее стабильной реакцией, присущей животным обеих исследованных нами линий, и не зависело от возраста. Первичное торможение, которое связывают с вовлечением тормозных интернейронов коры, у 2—3-месячных крыс линии WAG/Rij, когда пик-волновая активность еще не сформирована, было выявлено у ограниченного числа нейронов и было значимо меньше, чем у крыс линии Wistar. Это позволяло сделать заключение о дефиците тормозной регуляции у крыс WAG/Rij. Однако, по всей видимости, речь может идти только об афферентном (первичном) торможении, так как вторичное длиннолатентное торможение выявлено у большего числа нейронов крыс линии WAG/Rij, чем у крыс линии Wistar. Достаточно неожиданным оказалось восстановление баланса между первичным и вторичным торможениями к 6—7-месячному возрасту у крыс WAG/Rij – казалось бы, что структурно-функциональное формирование неокортекса должно было завершиться к 2-месячному возрасту. Возможно, обнаруженное нами явление реализуется за счет перестройки внутрикорковых связей у крыс WAG/Rij к периоду формирования АЭ, что могло бы отражать один из компенсаторных механизмов, препятствующих развитию патологии. Исследование этого вопроса требует продолжения, но мы полагаем, что нарушение баланса между первичным и вторичным торможениями у 2-3-месячных крыс WAG/Rij можно рассматривать, как одно из оснований развития у этих животных комбинированной патологии: АЭ и депрессии.

У 6-7-месячных крыс линии WAG/Rij, когда АЭ хорошо проявляется, выявлены существенные изменения вызванной активности нейронов соматосенсорной коры. Это проявляется в изменении структуры вторичного возбуждения ответа. У 33% нейронов этот компонент представлен фазными реакциями: короткими высокочастотными разрядами. По своей структуре эти разряды весьма схожи со вспышечной активностью нейронов, зарегистрированных в разных отделах мозга и синхронизированных с появлением пик-волновой активности [14, 15]. Существенным является тот факт, что период генерации обнаруженных нами фазных разрядов составляет 79.7 ± 16.7 мс, что соответствует диапазону частот пик-волновой активности, характерной для крыс линии WAG/Rij [4]. Это позволяет нам заключить, что фазная реакция является нейронным эквивалентом пик-волновой активности. являющейся электроэнцефалографическим признаком АЭ. Тот факт, что эта активность может быть инициирована стимуляцией вибрисс, подчеркивает значение соматосенсорной системы для патогенеза АЭ. При рассмотрении возможных механизмов генерации фазной активности следует иметь в виду, что она возникает в ответ на короткий одиночный стимул и представлена серией разрядов, количество которых может достигать восьми. Это, по нашему мнению, свидетельствует о вовлечении в процесс достаточно сложной нейронной организации, которая может включать таламо-кортикальные связи, а также и внутрикорковую системную организацию нейронов. Ранее было высказано предположение о существовании реверберационного механизма генерализации эпилептической активности, который опосредован задним ядром таламуса (РО) [11]. Нами установлено, что период генерации фазных разрядов в среднем составляет 80 мс. Такой временной интервал достаточен для реализации корково-таламо-кортикального возбуждения, что допускает участие механизма реверберации в генерации фазных разрядов, выявленных нами. Альтернативным механизмом может быть функциональное изменение в системе внутрикорковых связей, обусловливающее генерацию пейсмейкерной активности нейронов. Уточнение механизмов требует дальнейших исследований, но, принимая заключение, что фазная реакция является нейронным эквивалентом пик-волновой активности, мы вправе постулировать, что афферентное возбуждение от вибрисс способно инициировать приступ АЭ у крыс линии WAG/Rij.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-013-00176.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.В.Р.), сбор данных (Д.А.Ц., В.В.Р.), обработка данных (Д.А.Ц., В.В.Р.), написание и редактирование манускрипта (В.В.Р., Д.А.Ц.).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают искреннюю благодарность академику Александру Даниловичу Ноздрачеву, поддержавшему это направление исследований и рекомендовавшего первую работу из этой серии к публикации в журнале Доклады Академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. White H, Löscher W (2014) Searching for the ideal antiepileptogenic agent in experimental models: single treatment versus combinatorial treatment strategies. Neurotherapeutics 11: 373–384. https://doi.org/10.1007/s13311-013-0250-1
- 2. Sarkisova K, van Luijtelaar G (2011) The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression [corrected]. Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35: 854–876. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp. 2010.11.010
- 3. *Coenen A, van Luijtelaar G* (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. Behav Genetics 33: 635–655. https://doi.org/10.1023/a:1026179013847
- 4. Bosnyakova D, Gabova A, Zharikovae A, Gnezditski V, Kuznetsova G, van Luijtelaar G (2007) Some peculiarities of time-frequency dynamics of spike-wave discharges in humans and rats. Clin Neurophysiol 118: 1736–1743. https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.04.013
- 5. *Sitnikova E* (2011) Neonatal sensory deprivation promotes development of absence seizures in adult rats with genetic predisposition to epilepsy. Brain Res 1377: 109–118. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.067
- Aymen Balikci, Gul Ilbay, Nurbay Ates (2020) Neonatal tactile stimulations affect genetic generalized epilepsy and comorbid depression-like behaviors. Front Behav Neurosci 23(14): 132. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00132
- 7. Sitnikova E, Rutskova E, Raevsky V (2015) Reduction of epileptic spike-wave activity in WAG/Rij rats fostered by Wistar dams. Brain Res 1594: 305–309. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.067
- 8. Sarkisova K, Gabova A (2018) Maternal care exerts disease-modifying effects on genetic absence epilepsy and comorbid depression. Genes, Brain and Behavior 17: e12477. https://doi.org/10.1111/gbb.12477
- 9. *Sitnikova E, van Luijtelaar G* (2004) Cortical control of generalized absence seizures: effect of lidocaine applied to the somatosensory cortex in WAG/Rij rats. Brain Res 1012: 127–137. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.041
- 10. Lüttjohann A, Jan-Mathijs S, van Luijtelaar G (2014) Termination of ongoing spike-wave discharges investigated by cortico—thalamic network analyses. Neurobiol of Disease 70: 127–137. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.06.007

- 11. Lüttjohann A, van Luijtelaar G (2015) Dynamics of networks during absence seizure's on- and offset in rodents and man. Front Physiol 6: 16. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00016
- 12. Tsvetaeva D, Sitnikova E, Raevsky V (2019) Cortical Somatosensory Neurons in WAG/Rij Rats Transform Firing Evoked by Simulation of Posterior Thalamic Nucleus from Tonic to Phasic at Age of 6 Months. Bull Exp Biol Med 168: 1–4. https://doi.org/doi 10.1007/s10517-019-04632-8
- 13. Shubina O, Teltsov L, Komusova O (2015) Cytological and morphometric features of the cortex of white rats. Modern Problems Science and Education Issue № 2 (part 1).
- Pinault D, O'Brien T (2005) Cellular and network mechanisms of genetically-determined absence seizures. Thalamus and Related Systems 3: 181–203. https://doi.org/doi: . Epub 2007 Jan 22 https://doi.org/10.1017/S1472928807000209
- 15. Zheng T, O'Brien T, Morris M, Reid C, JovanovskaV, O'Brien P, Leena van Raay, Gandrathi A, Pinault D (2012) Rhythmic neuronal activity in S2 somatosensory and insular cortices contribute to the initiation of absence related spike and wave discharges. Epilepsia 53: 1948–1958. https://doi.org/doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03720.x

Responses of Somatic-Sensory Cortical Neurons to Vibrissae Area Stimulation in WAG/Rij Rats, Genetically Predisposed to Absence Epilepsy

D. A. Tsvetaeva^a, and V. V. Raevsky^{a, *}

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

*e-mail: vraevsky@mail.ru

Functioning of somatic-sensory system was studied in WAG/Rij rats, genetically predisposed to absence epilepsy (AE) and demonstrating depression-like behavior, during the periods when AE had not been formed yet (age 2-3 months) and when this pathology was well marked (age 6-7 months). Extracellular somatic-sensory cortex single unit responses to solitary electric stimulation of vibrissae area were recorded in healthy Wistar rats that served as control subjects. The evoked unit activity in somatic-sensory cortex in response to afferent stimuli was found to include four components, irrespective of the age and genetic line of animals: primary (short-latency) excitation and inhibition and secondary (long-latency) excitation and inhibition. In 2-3 month-old WAG/Rij rats, as compared to healthy Wistar rats, the number of short-latency inhibitory reactions was significantly smaller, while the number of long-latency inhibitory responses was significantly larger. It is postulated that the alteration of the balance of inhibitory mechanisms of various nature may determine the development of both AE and depression in WAG/Rij rats. It was fond that in 6-7-month-old WAG/Rij rats (when epileptic activity is well-formed) the secondary activation in response to afferent stimulation is represented mostly by multi-component high-frequency phasic reaction (alternations of neuron's responses and periods of inhibition). In Wistar rats of the same age the secondary excitation has a form of tonic reaction. The frequency of phasic discharges is compatible with the frequency of peak-wave activity what is electroencephalographic sign of AE. It is suggested that phasic reaction may be considered as a neuronal equivalent of epileptic activity and the peak-wave activity in WAG/Rij rats may be provoked by afferent stimulation

Keywords: neuron, somatosensory cortex, vibrissae, absence epilepsy, WAG/Rij rats

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ **—**

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ТИРОЛИБЕРИН ИНТЕГРАТОРОМ ПРОЛАКТИН-И ОКСИТОЦИН-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ И РОДИТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ ВО ВРЕМЯ ЛАКТАЦИИ У МЫШЕЙ?

© 2021 г. А. Г. Марков^{1, *}, Л. В. Шадрин², Н. М. Круглова¹, А. А. Федорова¹, И. А. Разговорова¹, М. П. Чернышева¹

¹Кафедра общей физиологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Общеуниверситетская Кафедра физической культуры и спорта, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: a.markov@spbu.ru

Поступила в редакцию 09.06.2021 г. После доработки 02.08.2021 г. Принята к публикации 10.08.2021 г.

Вскармливание самкой потомства секретом молочной железы является отличительным признаком млекопитающих. Определение вклада нейропептидов в нейроэндокринную регуляцию функций молочной железы и родительского поведения у млекопитающих и человека является приоритетным направлением для понимания этих процессов. Поскольку у лактирующих самок стимул сосания детенышами вызывает залповую секрецию пролактина, окситоцина и тиролиберина, в работе исследуется возможность влияния тиролиберина на пролактин-зависимый лактогенез и окситоцин-обусловленные рефлексы выведения молока, а также на компоненты материнского поведения. Установлено, что билатеральные интраназальные инфузии тиролиберина лактирующим самкам мышей специфически облегчают по сравнению с контролем лактационное поведение, но не пищевое или питьевое. Тиролиберин увеличивал продолжительность периодов кормления и число рефлексов выведения молока в ответ на сосание детенышей, увеличивая одновременно длительность интервалов между ними. Светооптическое и электронно-микроскопическое исследования показали достоверное изменение эпителиоцитов альвеол молочных желез, свидетельствующее об увеличении синтеза секрета молочной железы под влиянием трипептида. Это подтверждают более высокая скорость роста массы тела мышат и их лучшая выживаемость по сравнению с контролем. Отсутствие после хронических инфузий тиролиберина в низких дозах изменения концентрации тироксина и трийодтиронина в плазме крови самок, определенных иммуноферментным анализом, свидетельствует о неизменности их тиреоидного статуса. Предполагается, что тиролиберин включен в согласование механизмов формирования паттерна нейроэндокринного рефлекса выведения молока, поведенческих актов со стороны самки и усиление синтетической деятельности в молочной железе.

Ключевые слова: лактация, тиролиберин, материнское поведение, лактационное поведение, рефлекс выведения молока

DOI: 10.31857/S0869813921100071

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим условием выживания млекопитающих является вскармливание самкой своего потомства молоком. Нейроэндокринное обеспечение секреции молока и его выведения из молочной железы должно быть согласовано с лактационным поведением самки. Родительское поведение, в частности процесс вскармливания детенышей, обеспечивается комплексом биохимических и нейрофизиологических процессов, а также специализированными поведенческими актами [1]. Определение вклада нейропептидов в нейроэндокринную регуляцию функций молочной железы и родительского поведения у млекопитающих и человека является приоритетным для понимания этих процессов [2—4]. Среди различных нейропептидов, вовлеченных в регуляцию лактации, изучение вклада трипептида тиролиберина (тиротропин-рилизинг гормон) в этот процесс является одним из актуальных направлений. Предпосылками для повышенного внимания к участию тиролиберина в регуляции лактации и материнского поведения является его включенность в различные нейроэндокринные оси гипоталамо-гипофизарной системы и обширное распределение тиролиберинергических нейронов в мозге.

Мелкоклеточные зоны паравентрикулярных ядер гипоталамуса относятся к структурам мозга, в которых расположено большинство тиролиберинергических нейронов [5]. Тиролиберин как нейрогормон включен в реализацию гипоталамо-гипофизарной пролактиновой оси, направленной на поддержание, в первую очередь, синтетический активности молочной железы [6]. Раздражение механорецепторов молочной железы при кормлении детенышей приводит к увеличению мРНК тиролиберина в паравентрикулярном ядре гипоталамуса. Этот ответ связан с повышенным уровнем пролактина в кровотоке [7, 8]. Напротив, у мышей нокаутных по тиролиберину во время лактации уровень мРНК пролактина в гипофизе и в сыворотке крови был значительно снижен по сравнению с мышами дикого типа. Восстановление уровня пролактина произошло при заместительном введении трипептида [9].

Тиролиберин действует как пролактолиберин двумя путями. Гипофизотропные нейроны секретируют в перикапиллярное пространство внешней зоны срединного возвышения тиролиберин, который с током крови достигает аденогипофиза, стимулируя секрецию пролактина [10]. Кроме этого, выделение тиролиберина в тубероинфундибулярной области гипоталамуса снижает активность дофаминергических нейронов, обеспечивающих хроническое торможение секреции пролактина [11]. Наличие феномена дендритно-соматического взаимодействия между различными популяциями нейронов в гипоталамусе, основанного на секреции тиролиберина в пределах паравентрикулярного ядра, может усиливать активность окситоцинергических нейронов крупноклеточных зон этого ядра [12, 13]. Электрофизиологические данные показывают, что нейросекреторная популяция окситоцинергических нейронов запускает высокочастотный разряд потенциалов действия, что приводит к высвобождению окситоцина из нервных окончаний в нейрогипофизе [14] и сокращению миоэпителиальных клеток молочной железы [15]. Следовательно, нейроэндокринный рефлекс выведения молока у самки, а также поведенческие акты его обуславливающие, является ключевым событием доступности молока для потомства. Окситоцин важен для социального взаимодействия и материнского поведения [16].

Вместе с тем неизвестно, каков механизм обеспечения взаимодействия пролактин- и окситоцин-зависимых процессов лактации и родительского поведения. Одним из нейропептидов, включенных в регуляцию этих процессов, может быть нейропептид тиролиберин, известный своей полифункциональностью [17]. Этот трипептид способен избирательно влиять на различные компоненты поведения, в частности, на поведение при неизбегаемом стрессе [18]. Поскольку в ответ на стимулы сосания и механическое раздражение молочной железы доступность для

потомства секрета молочной железы обеспечивается выделением пролактина из аденогипофиза [19] и окситоцина из нейрогипофиза [6, 14], можно предположить, что тиролиберин одновременно включен в регуляцию лактационного процесса и материнского поведения. Однако этот вопрос остается неисследованным.

Одним из адекватных способов изучения роли нейропептидов в регуляции функций мозга является интраназальный способ их введения [18, 20, 21]. Исследования показывают, что использование этого методического подхода позволяет обойти гематоэнцефалический барьер, а также влиять на деятельность нейронов различных отделов головного мозга [21, 22]. Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния тиролиберина на лактационное поведение и функцию молочной железы мышей при его интраназальном введении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

В экспериментах использовали самок мышей (масса тела 30–40 г, n=16), полученных из питомника лабораторных животных "Рапполово" Национального исследовательского центра "Курчатовский институт". Животных содержали на стандартном рационе вивария при свободном доступе к пище и воде. Каждая самка с потомством содержалась в отдельной клетке при температуре воздуха $20\pm2^{\circ}\mathrm{C}$ в условиях фиксированного стандартного освещения (12 ч свет/12 ч темнота). Протокол эксперимента соответствовал требованиям Директивы ЕС $2010/63/\mathrm{EU}$ для экспериментов на животных и был одобрен этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета (опубликован 13 декабря 2017 г.).

Животных разбивали на группы, которые были подобраны по количеству мышат в гнезде. В контрольной группе (n=4) мыши вскармливали потомство без введения каких-либо препаратов. В группе плацебо (n=4) самкам билатерально апплицировали (10 мкл) в носовую полость физиологический раствор (0.9%-ный раствор NaCl), в опытных группах — тиролиберин в дозе 120 нг/кг (n=4) и 0.012 нг/кг (n=4).

Общая схема эксперимента

В экспериментах было исследовано влияние длительного интраназального введения тиролиберина на лактационное поведение самок, изменение массы тела мышат, а также на потребление воды и корма самками. Введение нейропептида начинали на следующий день после родов, принимая его как первый день эксперимента. Аппликацию растворов осуществляли в течение десяти дней в утренние часы (10.00—12.00). В течение двух дней после заключительной аппликации тиролиберина регистрировали параметры лактационного поведения. После завершения поведенческих опытов на 12-е сутки эксперимента (2-е сутки после последней аппликации тиролиберина) у самок собирали (10.00—12.00) кровь, в сыворотке которой определяли концентрации тироксина и трийодтиронина. Выбор доз тиролиберина был основан на анализе его влиянии на поведение при его интраназальном введении [23].

Изучение лактационного поведения

Наблюдение за поведением самок каждой группы осуществлялось в течение двух дней после последней аппликации тиролиберина: первый день — с 13.00 до 16.00, во второй день — с 10.00 до 13.00. В эти часы осуществляется наибольшее количество поведенческих актов лактационного поведения [24]. Для оценки поведения животных в период лактации были выделены следующие поведенческие акты. Лактационное поведение — поведенческая и физиологическая активность самки,

направленная на обеспечение выхаживания потомства и доступности секрета молочной железы для детенышей. Этот процесс состоит из двух поведенческих реакций — "забота о потомстве" и "вскармливание". "Забота о потомстве" относится к формам лактационного поведения, направленным на поддержание условия кормления и сохранение потомства. Для оценки степени заботы самки о потомстве регистрировали частоту и продолжительность активности самки по строительству и поддержанию гнезда, груминг мышат, контактный отдых самки с мышатами без процесса кормления. Вскармливание потомства – поведенческие акты самки, направленные на получение детенышами секрета молочной железы. Они включают в себя периоды кормления и перерывы между ними и характеризуются определенной динамикой осуществления рефлексов выведения молока. Частота возникновения рефлексов выведения молока, латентный период первого рефлекса, периодичность этих рефлексов отражают индивидуальный нейроэндокринный статус самки, направленный на получение молока потомством. Кормление считалось начавшимся в тот момент, когда более половины мышат после активного поиска прикреплялось к соскам, и закончившимся, когда самка освобождалась от детенышей, покидая гнездо. Латентный период первого рефлекса выведения молока также отсчитывался с момента прикрепления не менее половины детенышей к соскам. Показателем осуществления рефлекса выведения молока является характерная синхронизированная двигательная активность детенышей. Момент ее осуществления соответствует повышению концентрации окситоцина в крови самки [25].

Измерение массы тела у мышат

По динамике массы тела потомства судили об успешности кормления, так как известно, что между количеством полученного молока и массой тела детеныша существует пропорциональная зависимость с высоким положительным коэффициентом корреляции. Поэтому этот метод позволяет оценивать эффективность процесса кормления и широко используется в исследованиях лактации [26]. Определение массы тела потомства проводили ежедневно, процедуру взвешивания проводили трехкратно на весах Sartorius-1602 MP (Германия). Для сравнения эффективности процесса кормления и интенсивности получения молока мышатами у самок с разным количеством детенышей рассчитывалось увеличение массы тела одного детеныша за сутки. Сравнивали увеличение массы тела мышат между первым и вторым днем с увеличением этого показателя между девятым и десятым днем введения тиролиберина.

Иммуноферментный анализ

После проведения цервикальной дислокации брали кровь для определения концентрации свободных тироксина и трийодтиронина. Пробы крови отстаивали и затем центрифугировали в течение 10 мин при 220 g (Eppendorf AG, США). Сыворотку хранили в замороженном состоянии при температуре -20° С. Тироксин и трийодтиронин определяли с помощью наборов реактивов для твердофазного иммуноферментного анализа "ТироидИФА-свободный Т4" и "ТироидИФА-свободный Т3" (АлкорБио, Россия), на автоматическом анализаторе (Alisei, Италия) по методике соответствующих тест-систем. Чувствительность при определении FT4 составляла 1 пмоль/л, а для FT3 - 0.5 пмоль/л.

Гистологические методы исследования ткани молочной железы. Электронная микроскопия

В целях стандартизации условий эксперимента для проведения морфометрического анализа и электронной микроскопии мастэктомии подвергались паховые (*inguinal*

mammary gland) молочные железы самок. Фрагменты ткани молочной железы, взятые для исследования, подвергались обработке по следующей схеме: префиксация в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) с хлоридом кальция (1%), в течение 2 ч при температуре 4°С; постфиксация в 2%-ном растворе четырехокиси осмия (OsO_4) на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) в течение 2 ч при температуре 4°C; промывка и обезвоживание в серии спиртов возрастающей концентрации. Затем следовало пропитывание заливочной средой и переход к следующим этапам: заливке в отвердевающую смолу "Эпон" и помещению блоков в термостат для полимеризации. Режим полимеризации проходил при возрастающей температуре: 1) при температуре $35^{\circ}\text{C} - 24 \text{ y}$; 2) $45^{\circ}\text{C} - 24 \text{ y}$; 3) $60^{\circ}\text{C} - 24 \text{ y}$. Для выявления зон, оптимальных для электронно-микроскопического исследования, получали полутонкие срезы на ультратоме LKB-V (Швеция). Затем срезы помещали на предметное стекло и окрашивали толуидиновым синим. Препараты смотрели под микроскопом JEM-1400, и, отметив область, пригодную для электронно-микроскопического исследования, переходили к ультратонким срезам. Окраска срезов проводилась уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривали в трансмиссионном (просвечивающем) электронном микроскопе JEM-100C (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Морфометрический анализ полутонких срезов гистологических препаратов проводили с помощью компьютерной системы интерактивного анализа изображения "ВидеоТест" ("ИСТА-ВидеоТест", Россия). Увеличение микроскопа при измерении диаметров составляло ×250, а при измерении высоты лактоцитов — ×400. Подсчеты производились только на поперечных срезах альвеол с использованием двойного слепого метода. Для проведения морфометрии брали по два образца молочной железы от одной самки. Срезы с каждого образца в количестве от 5 до 10 штук монтировали на два предметных стекла. Количественные показатели альвеол измеряли в десяти случайно выбранных полях зрения. При изучении влияния тиролиберина на строение железистого эпителия альвеолы молочной железы оценивали диаметр альвеол (D) и высоту секреторного эпителия (W), так как эти показатели отражают функциональную активность секреторных клеток.

Для оценки D измеряли у альвеолы ее максимальный диаметр (d_1) (наибольшее расстояние между двумя точками окружности) и минимальный диаметр (d_2) (наименьшее расстояние между двумя точками окружности). На каждом препарате подсчитывался диаметр 15-20 альвеол. Геометрическая конфигурация альвеолы соответствует эллипсу, поэтому средний D вычислялся как квадратный корень из произведения обоих диаметров альвеолы (эллипса) молочной железы: $D = \sqrt{d_1 d_2}$. W измерялась путем вычисления расстояния между точками, находящимися на базальной и апикальной мембранах. На основании этих показателей вычислялась площадь поверхности и объем полости альвеолы молочной железы. Площадь поверхности альвеолы (эллипса) вычислялась как произведение двух диаметров альвеолы (без поправки на отношение $4/\pi$ ($\pi = 3.14$)): $S = d_1 d_2$. Объем полости альвеолы молочной железы вычислялся по формуле V = 4/3 πr^3 , где r- радиус альвеолы, который рассчитывается как D/2-W.

Состав растворов и концентрации физиологически активных веществ

Для приготовления растворов использовали реактивы фирмы Sigma Aldrich (Германия). Для интраназального введения использовали тиролиберин в дозе 120 и 0.012 нг/кг массы тела животного (Sigma, США).

Группы	Строительство гнезда		Груминг мышат		Контактный отдых		
животных	кол-во	время, мин	кол-во	время, мин	кол-во	время, мин	
Интактные	6	4.2 ± 0.7	7	3.0 ± 0.6	15	8.0 ± 1.5	
Плацебо	7	4.1 ± 0.6	6	3.3 ± 0.9	14	6.0 ± 1.1	
Тиролиберин 120 нг/кг	10	3.2 ± 0.6	5	6.3 ± 1.5	13	6.2 ± 1.5	
Тиролиберин 0.012 нг/кг	9	3.0 ± 0.6	8	4.2 ± 1.5	13	7.2 ± 1.1	

Таблица 1. Частота и длительность поведенческих актов, характеризующих "Заботу о потомстве" после интраназального введения тиролиберина самкам

Статистическая обработка результатов исследований

Статистическая обработка результатов проводилась общепринятыми методами с использованием компьютерной статистической программы GraphPad Prism 8 (GraphPad; San Diego, CA, США). Для обработки данных использовали тест One-Way ANOVA с поправкой Даннета. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Д'Агостино—Пирсона. Уровень достоверности p < 0.05 был принят как статистически значимый. Данные представлены в виде средней арифметической \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Радиоиммунное определение свободного тироксина и трийодтиронина

В сыворотке крови контрольной и опытных групп животных радиоиммунным методом была определена концентрация свободного трийодтиронина и тироксина. В контрольной группе концентрация этих гормонов составила 2.8 ± 0.2 и 66 ± 10 нМ (n=4) соответственно. Применение тиролиберина в дозе 120 и 0.012 нг/кг не привело к достоверному изменению концентрации этих гормонов. Их величина была равна 2.9 ± 0.1 и 75 ± 5 , а также 3.0 ± 0.2 и 80 ± 6 нМ (n=4 для всех групп; p>0.05) соответственно.

Изучение влияния тиролиберина на лактационное поведение самок мышей

Количество и продолжительность поведенческих актов, характеризующих признаки поведения "Забота о потомстве", у самок мышей при введении тиролиберина не изменились по сравнению с контрольной группой и группой плацебо (табл. 1).

Динамика рефлексов выведения молока и продолжительность кормления

Интраназальное введение тиролиберина вызывало изменения в процессе кормления. Вскармливание потомства в первую очередь определяется динамикой осуществления рефлексов выведения молока, в это время действие окситоцина вызывает сокращение миоэпителиальных клеток альвеол и, таким образом, обеспечивает доступность секрета детенышам [15]. Применение тиролиберина в дозе 0.012~нг/кr привело к достоверному повышению количества рефлексов по сравнению с контролем (7 \pm 1 и 4 \pm 1 рефлекс, n=7, p<0.05) (рис. 1a). Латентный период первого рефлекса выведения молока достоверно увеличился при применении тиролиберина в дозе 120~нг/кr (n=17; p<0.05) (рис. 1b), однако интервал между рефлексами увеличился. В контрольной группе он составлял $7.0\pm0.6~\text{мин}$ (n=40), в

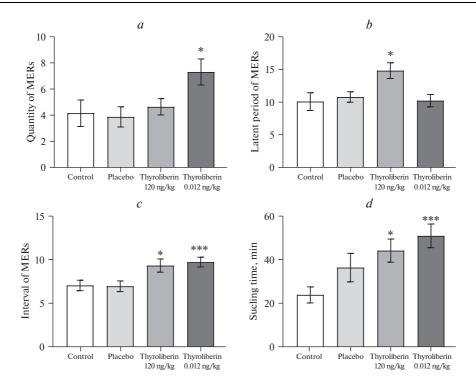


Рис. 1. Параметры лактационного поведения самки мышей при интраназальном введении тиролиберина. MER (Milk Ejection Reflex) — рефлекс выведения молока.

группе тиролиберин в дозе 120 нг/кг -9.4 ± 0.9 мин (n=30, p=0.015) (рис. 1b). В опытных группах, в соответствии с увеличением рефлексов и интервалом между ними, увеличилось время кормления. Так, тиролиберин в дозе 0.012 нг/кг увеличивал продолжительность кормления в два раза $-c24\pm4$ мин (n=9) в контрольной группе до 51 ± 5 мин (n=19) в опытной (рис. 1d). Достоверной разницы между группами контроль и плацебо так же, как между двумя опытными группами, обнаружено не было. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что интраназальное введение тиролиберина в первую очередь оказывает влияние на параметры поведения, связанные с кормлением самкой потомства.

Изменение массы тела детенышей

Количество детенышей в гнездах у самок мышей после родов было различным и составляло от 2 до 10 мышат. В процессе вскармливания потомства обычно происходит гибель некоторого количества мышат. Сохранение численности потомства также является характеристикой успешности лактации. В контрольной группе погибло в общей совокупности семь детенышей, в группе плацебо — три, в группе тиролиберин — 120 нг/кг — один, в то время как в группе тиролиберин — 0.012 нг/кг не погибло ни одного мышонка. Таким образом, в группах, которым вводили тиролиберин, гибель детенышей была существенно ниже или отсутствовала по сравнению с контрольной группой и группой плацебо. Во всех группах регистрировалось постоянное увеличение массы тела потомства. Суммарная прибавка массы одного

^{*-}p < 0.05, ***-p < 0.001 по сравнению с контрольной группой.

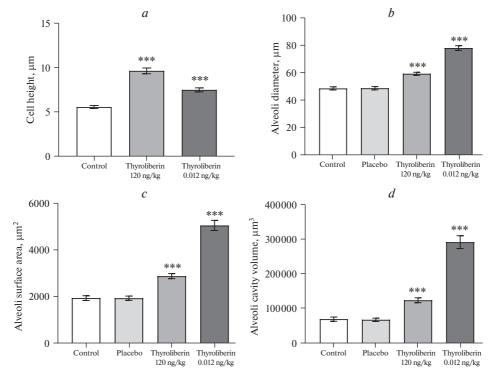


Рис. 2. Морфометрия альвеолы молочной железы мыши при интраназальном применении тиролиберина. *-p < 0.05, ***-p < 0.001 по сравнению с контрольной группой.

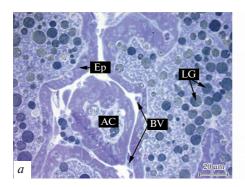
мышонка в контрольной группе составила 0.4 ± 0.1 г (n=12), а в группе плацебо -0.5 ± 0.1 г (n=14). Так как отсутствовала достоверная разница в показателях этих групп, их значения были объединены, и они рассматривались как единая контрольная группа. В группе с введением самкам тиролиберина в дозе 120 нг/кг прирост массы тела мышонка составил 0.7 ± 0.1 г (n=28), и он не отличался от контрольной группы (p>0.05). Инфузия самкам тиролиберина в дозе 0.012 нг/кг привела к достоверному увеличению прироста массы тела детеныша по сравнению с контрольной группой до 0.8 ± 0.2 г (n=32, p<0.05).

Влияние тиролиберина на потребление пищи и воды

В интактной группе и группе плацебо показатели потребления воды и корма не отличались, поэтому были объединены в одну контрольную группу. Введение тиролиберина в обеих дозах не привело к каким-либо изменениям в потреблении корма и воды по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Таблица 2. Потребление корма и воды самками после интраназального введения тиролиберина

Группа	Потребление корма, г	Потребление воды, г
Контрольная группа ($n = 8$)	14.2 ± 2.0	15.2 ± 1.8
Тиролиберин в дозе 120 нг/кг ($n=4$)	11.4 ± 1.6	11.1 ± 1.3
Тиролиберин в дозе $0.012 \mathrm{Hr/kr}$ ($n=4$)	12.4 ± 1.7	14.3 ± 1.5



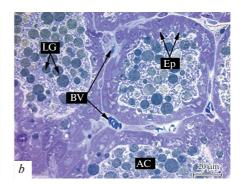


Рис. 3. Гистология альвеолы молочной железы контрольной (a) и опытной (b) групп животных (полутонкие срезы, окраска толуидиновым синим).

Ep – эпителий, BV – кровеносный сосуд, AC – полость альвеолы, LG – липидные капли.

Морфометрический анализ размеров альвеол молочной железы

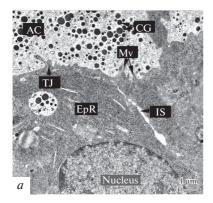
Величина морфометрических параметров в интактной группе и группе плацебо не отличались, поэтому эти данные были объединены в общую контрольную группу. Общим результатом применения тиролиберина стало увеличение всех параметров, характеризующих размеры альвеолы. Высоты секреторных клеток достоверно увеличилась с 5.6 ± 0.2 мкм (n = 198) в контроле до 9.7 ± 0.3 (n = 199, p < 0.001) и 7.5 \pm 0.2 мкм (n = 197, p < 0.001) при применении тиролиберина в дозе 120 и 0.012 нг/кг соответственно (рис. 2a). Диаметр альвеол также увеличивался при применении тиролиберина; контрольные значения составили 48.2 ± 1.1 мкм (n=177), при применении тиролиберина в дозе 120 нг/кг -58.9 ± 1.1 мкм (n=150) и при применении тиролиберин в дозе $0.012 \text{ нг/кг} - 77.7 \pm 1.7 \text{ мкм}$ (n = 132, p < 0.001) (рис. 2b). Расчетные параметры, а именно площадь альвеолы и объем полости альвеол, показали, что тиролиберин в дозе 0.012 нг/кг оказал выраженный стимулирующий эффект. Так, площадь альвеолы увеличилась почти в три раза для тиролиберина в дозе 0.012 нг/кг, достигая величины 5040 ± 216 мкм 2 (n=132) по сравнению с контролем — 1926 ± 101 мкм² (n = 177, p < 0.001) (рис. 2c). Объем полости альвеолы при применении тиролиберина в дозе 0.012 нг/кг увеличился в несколько раз, составив 292981 мкм³ (n = 132, p < 0.001) по сравнению с контрольной группой — 69335 мкм^3 (n = 177, p < 0.001) (рис. 2d).

Светооптическая микроскопия

Светооптическая микроскопия подтверждает увеличение размеров клеток секреторного эпителия и диаметра альвеол при действии тиролиберина (рис. 3). Остальные элементы ткани молочной железы не имеют видимых отличий в контрольной и опытных группах животных. Альвеолы разделены между собой слоями соединительной ткани, пронизанной кровеносными сосудами. В полости альвеол расположены липидные капли.

Изменение ультраструктуры секреторных клеток

Особенности ультраструктуры секреторного эпителия молочной железы позволяют четко идентифицировать на электронограммах апикальную и базальную часть эпителиальных клеток. Апикальная мембрана обращенных в просвет альвеол



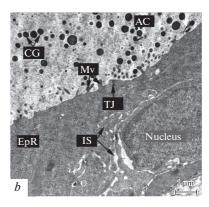


Рис. 4. Ультраструктура секреторного эпителия молочной железы контрольной (a) и экспериментальной (b) групп животных.

AC — полость альвеолы, TJ — плотный контакт, Mv — микроворсинки, CG — гранулы казеина, IS — меж-клеточное пространство, EpR — эндоплазматичский ретикулум.

покрыта микроворсинками. На всех электронограммах альвеол хорошо видны плотные контакты, которые расположены в апикальных областях соседних эпителиоцитов. Нарушения целостности альвеол при действии тиролиберина не обнаружено, тканевой барьер между полостью альвеолы и межклеточным пространством не изменен. Цитоплазма секреторных клеток содержала большое количество рибосом, которые располагались свободно в цитоплазме или локализовались на поверхности хорошо развитого эндоплазматического ретикулума. В секреторных клетках молочной железы присутствовало множество секреторных везикул, которые обнаружены в апикальной области и полностью отсутствовали в базальной области секреторных клеток. Ядра в клетках секреторного эпителия смещены к базальной области, имели в основном вытянутую форму. При анализе электронограмм обращает на себя внимание увеличение межклеточного пространства при действии тиролиберина. В контрольной группе межклеточное пространство ориентировано в апико-базальном направлении, в то время как в экспериментальной группе межклеточное пространство между эпителиоцитами имеет спиралевидную форму, подчеркивая изменение в пространственной конфигурации эпителиоцитов (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нейропептиды, действующие как нейрогормоны и нейромедиаторы, возможно, играют роль интеграторов поведенческих реакций животного и физиологических процессов в его организме. Хорошо известно, что тиролиберин выполняет также функцию пролактолиберина, обеспечивая синтетическую активность эпителиоцитов молочной железы в ходе лактации [6, 9]. Межклеточное взаимодействие тиролиберинергических нейронов с крупноклеточными окситоцинергическими нейронами гипоталамуса служит той основой [12, 13], которая позволяет рассматривать этот трипептид в качестве модулятора поведенческих реакций самки при кормлении. Именно это предположение было взято в качестве рабочей гипотезы, которую проверяли при интраназальном введении тиролиберина, моделируя таким образом его действие на структуры головного мозга. В результате было установлено: 1) тиролиберин оказывает действие на синтетические процессы в молочной железе и изменяет параметры лактационного поведения самки; 2) трипептид оказывает различное влияние на отдельные компоненты материнского поведения; 3) тиролибе-

рин в примененных дозах не изменяет процессы и поведение, связанные с поддержанием энергетического состояния животного. Отсутствие изменения концентрации гормонов щитовидной железы в плазме крови указывает на то, что наблюдаемые изменения являются результатом физиологических эффектов тиролиберина.

В нашем исследовании тиролиберин вызывал изменения высоты клеток, диаметра альвеол, объема их полости, которые можно рассматривать как признаки усиления синтетической деятельности альвеолы молочной железы. Изменение парацеллюлярного пространства, показанное электронной микроскопией, также характерно при активации секреции в эпителии [27, 28]. Увеличение прибавки в массе тела детенышей дополнительно свидетельствует об усиленной синтетической деятельности молочной железы. Однако не стоит считать, что данные изменения являются результатом прямого действия тиролиберина на секреторные клетки альвеол молочной железы. Интраназальный способ введения и применяемые дозы тиролиберина исключают такую возможность.

Известно, что длительная механическая стимуляция механорецепторов соска при сосании вызывает повышение в плазме крови самки не только уровня пролактина [10, 29] и окситоцина [14], но и тиролиберина [5, 7]. Это позволяет предположить возможность модуляции эффектов пролактина и окситоцина интраназально вводимым трипептидом. Подтверждением тому является двоякое проявление функции тиролиберина как пролактолиберина: трипептид усиливает синтез пролактина в аденогипофизе [9] и тормозит при сосании секрецию допамина, ингибитора пролактина [11]. Важно подчеркнуть, что окситоцин синергично воздействует на эту же группу допаминергических нейронов гипоталамуса [30], увеличивая синтез пролактина в лактотропоцитах. В молочных железах окситоцин, как известно, вызывает сокращение миоэпителиальных клеток протоков и оказывает влияние на выведение молока [15]. Анализ результатов светооптического и электронно-микроскопического исследований структуры альвеол свидетельствует об увеличении уровня секреторной активности эпителиоцитов альвеол молочной железы после интраназального введения трипептида, что можно трактовать как свидетельство усиления эффектов пролактина. На рост уровня секреции молока указывает также увеличение продолжительности периодов кормления и массы тела детенышей. Поскольку отмечено и повышение числа рефлексов выведения молока, то в нейроэндокринный паттерн обеспечения лактации, формируемый тиролиберином, можно включить не только пролактин, но и окситоцин. Можно предположить, что формирование паттерна тиролиберин/окситоцин/пролактин в ответ на сосание представляет собой механизм селекции определенных функций каждого из этих полифункциональных гормонов в нейроэндокринном профиле организма самки в ходе лактации. Действительно, тиролиберин, способный у самок вне лактации вызвать секрецию тиреотропина, соматотропина и пролактина [5, 17, 31], в период лактации, как показали наши результаты, не увеличивает концентрацию тиреоидных гормонов и не изменяет аппетита. Заметим, что у лактирующих животных потребность в пище и воде может быть повышена. Однако вне лактации аппетит активируется орексигенными нейронами аркуатного ядра под влиянием ряда периферических и гипоталамических гормонов [32].

Материнское поведение в период лактации можно разделить на поведенческие акты, различающиеся по исходной мотивации и имеющие различную моторную составляющую ("забота о потомстве"), а также на те, что связаны с процессом получения молока детенышами. Тиролиберин оказал дифференцированное влияние на поведение во время лактации. Формы поведения, которые определены как "забота о потомстве", оказались не восприимчивы к действию трипептида. Следовательно, тиролиберин не включен в модуляцию сложных и разнообразных форм материнского поведения.

Поскольку лактационное поведение является одной из хорошо документированных функций пролактина и окситоцина [16, 33], то представляет интерес анализ изменений его компонентов поведения при интраназальном введении тиролиберина. Основной эффект введения тиролиберина сводится к изменению временного паттерна поведения самок, связанного со вскармливанием. Динамика рефлексов выведения молока, осуществляющихся в период кормления, является той физиологической основой, которая обеспечивает получение молока детенышами. Основной эффект тиролиберина проявляется в увеличении продолжительности всех элементов вскармливания. Происходит увеличение латентного периода первого рефлекса выведения молока, интервала между рефлексами, общего времени кормления. Увеличение количества рефлексов выведения молока может быть связано с удлинением времени кормления и, как следствие, увеличением их числа. Особенно стоит отметить увеличение интервала между рефлексами выведения молока. Установлено, что именно этот параметр практически не меняется во время кормления, при отсутствии внешних помех при кормлении детенышей рефлексы выведения молока возникают с автоматической точностью [25]. Следовательно, на центральном уровне, скорее всего на уровне гипоталамуса, тиролиберин способен влиять на механизмы формирования паттерна нейроэндокринного рефлекса выведения молока.

Стоит обратить внимание на то, что при применении доз тиролиберина, различающихся на четыре порядка, был получен сходный физиологический ответ. Мы предполагаем, что интраназальный способ доставки тиролиберина к структурам ЦНС не является специфическим путем регуляции функций мозга. Тем не менее, показано непосредственное регулирующее влияния тиролиберина на уровне плазматической мембраны нейронов дыхательного центра [33]. Возможно, что при поступлении тиролиберина в пороговой концентрации в мозг происходит изменение функций нейронов. Это изменение может являться триггером к изменению активности мозговых структур и не зависеть от концентрации нейропептида.

В исследованиях материнского поведения в настоящее время можно проследить несколько направлений: выявление генов, связанных с родительской заботой, изучение совокупности структур ЦНС и нейроэндокринного базиса материнского поведения, а также исследование его компонентов. Такой разносторонний подход оказался чрезвычайно плодотворным. Так, созданы постоянно расширяющиеся схемы/карты структур ЦНС, участвующих в регуляции родительского поведения [1, 2, 35]. Заметим, что повреждение паравентрикулярных ядер блокировало запуск материнского поведения [36]. В геноме мышей выделены 12 областей, связанных с родительской заботой [37]. К числу гормонов, участвующих в регуляции материнского поведения и лактационного процесса, сегодня, помимо пролактина и окситоцина, отнесены галанин [4, 38], инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-I) и связывающий его белок (IGFI-Binding Protein3; IGF1-BP3) [22] и тубероинфундибулярный пептид 39 (ТІРЗ9) [39]. Наше исследование позволяет предполагать, что на уровне гипоталамуса тиролиберин может влиять на механизмы формирования паттерна нейроэндокринного рефлекса выведения молока, обеспечивая согласование усиления синтетической деятельности в молочной железе и необходимых поведенческих актов со стороны самки.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Санкт-Петербургским государственным университетом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (М.А.Г.), получение экспериментальных данных (М.А.Г., Ш.Л.В., К.Н.М.), обработка результатов (М.А.Г., Ш.Л.В., К.Н.М., Ф.А.А., Р.И.А.), написание и редактирование рукописи статьи (М.А.Г., Ш.Л.В., К.Н.М., Ф.А.А., Р.И.А., Ч.М.П.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Kohl J, Babayan BM, Rubinstein ND, Autry AE, Marin-Rodriguez B, Kapoor V, Miyamishi K, Zweifel LS, Luo L, Uchida N, Dulac C (2018) Functional circuit architecture underlying parental behaviour. Nature 556: 326–331. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0027-0
- 2. Numan M, Insel TR (2011) The Neurobiology of Parental Behavior. Springer. New York.
- 3. Cservenák M, Szabó ÉR, Bodnár I, Lékó A, Palkovits M, Nagy GM, Usdin TB, Dobolyi A (2013) Thalamic neuropeptide mediating the effects of nursing on lactation and maternal motivation. Psychoneuroendocrinology 38: 3070–3084. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.09.004
- 4. Cservenák M, Kis V, Keller D, Dimén D, Menyhárt L, Oláh S, Szabó ÉR, Barna J, Renner É, Usdin TB, Dobolyi A (2017) Maternally involved galanin neurons in the preoptic area of the rat. Brain Struct Funct 222: 781–798. https://doi.org/10.1007/s00429-016-1246-5
- Fekete C, Lechan RM (2014) Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. Endocrin Rev 35: 159–194. https://doi.org/10.1210/er.2013-1087
- Crowley WR (2015) Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. Compr Physiol 5: 255–291. https://doi.org/10.1002/cphy.c140029
- 7. *Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P* (1993) Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. Neuroendocrinology 58:140–145. https://doi.org/10.1159/000126523
- 8. Sánchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL, Joseph-Bravo P (2001) Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 74: 407–422. https://doi.org/10.1159/000054707
- 9. Yamada M, Shibusawa N, Ishii S, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Monden T, Satoh T, Hirato J, Mori M (2006). Prolactin secretion in mice with thyrotropin-releasing hormone deficiency. Endocrinology 147: 2591–2586. https://doi.org/10.1210/en.2005-1326
- Rodríguez-Rodríguez A, Lazcano I, Sánchez-Jaramillo E, Uribe RM, Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, Charli JL (2019) Tanycytes and the Control of Thyrotropin-Releasing Hormone Flux Into Portal Capillaries. Front Endocrinol (Lausanne) 10: 401. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00401
- 11. *Thörn Pérez C, Ferraris J, van Lunteren JA, Hellysaz A, Iglesias MJ, Broberger C* (2020) Adaptive Resetting of Tuberoinfundibular Dopamine (TIDA) Network Activity during Lactation in Mice. J Neurosci 40: 3203–3216. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1553-18.2020
- 12. Son SJ, Filosa JA, Potapenko ES, Biancardi VC, Zheng H, Patel KP, Tobin VA, Ludwig M, Stern JE (2013) Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks. Neuron 78: 1036–1049. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.025
- 13. Stern JE (2015) Neuroendocrine-autonomic integration in the paraventricular nucleus: novel roles for dendritically released neuropeptides. J Neuroendocrinol 27: 487–497. https://doi.org/10.1111/jne.12252
- Wakerley JB, Dyball RE, Lincoln DW (1973) Milk ejection in the rat: the result of a selective release of oxytocin. J Endocrinol 57: 557–558. https://doi.org/10.1677/joe.0.0570557
- 15. *Марков АГ* (2001) Исследование сократительных реакций миоэпителиальных клеток молочной железы мышей *in situ*. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 87: 1656—1661. [*Markov AG* (2001) Contractile responses of the myoepithelial cells of the mouse mammary gland in situ. Russ J Physiol 87: 1656—1661. (In Russ)].
- Marlin BJ, Mitre M, D'amour JA, Chao MV, Froemke RC (2015) Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. Nature 520: 499–504. https://doi.org/10.1038/nature14402

- 17. Ашмарин ИП (2001) Прогнозируемые и неожиданные физиологические эффекты олигопептидов (гликопролинов, аналогов АКТГ4-10, тафцина и тиролиберина). Рос физиол журн 87: 1471—1476. [Ashmarin IP (2001) Anticipated and unexpected physiological effects of oligopeptides (glyprolines, ACTH (4-10) analogs, taftsin, and thyroliberin). Russ J Physiol 87: 1471—1476. (In Russ)].
- 18. Виноградова ЕП, Каргин АВ, Жуков ДА, Марков АГ (2014) Влияние тиреолиберина на поведенческий компонент стрессорного ответа у крыс Вистар. Журн. высш нерв деят им ИР Павлова 64: 660–667. [Vinogradova EP, Kargin AV, Zhukov DA, Markov AG (2014) Intransal application of a thyrotropin-releasing hormone attenuates state-anxiety of the rats. Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova 64: 660–667. (In Russ)].
- Alekseev NP, Ilyin VI, Yaroslavski VK, Gaidukov SN, Tikhonova TK, Specivcev YA, Omelyanjuk EV, Tk-achenko NN (1998) Compression stimuli increase the efficacy of breast pump function. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 77: 131–139. https://doi.org/10.1016/s0301-2115(97)00269-8
- 20. Sukhov IB, Lebedeva MF, Zakharova IO, Derkach KV, Bayunova LV, Zorina II, Avrova NF, Shpakov AO (2020) Intranasal Administration of Insulin and Gangliosides Improves Spatial Memory in Rats with Neonatal Type 2 Diabetes Mellitus. Bull Exp Biol Med 168: 317–320. https://doi.org/10.1007/s10517-020-04699-8
- 21. Yeomans DC, Hanson LR, Carson DS, Tunstall BJ, Lee MR, Tzabazis AZ, Jacobs D, Frey 2nd WH (2021) Nasal oxytocin for the treatment of psychiatric disorders and pain: achieving meaningful brain concentrations. Transl Psychiatry 11: 388. https://doi.org/10.1038/s41398-021-01511-7
- 22. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey 2nd WH (2004) Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. Neuroscience 127: 481–496. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.05.029
- 23. Ашмарин ИП, Асанова ЛМ, Аббасова КР, Чепурнова НЕ, Коссова ГВ, Чепурнов СА, Инюшкин АН, Гончаров ОБ (2003) Нейропептид тиролиберин противосудорожная защита мозга в сверхмалых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология. 43(3): 324—327. [Ashmarin IP, Asanova LM, Abbasova KR, Chepurnova NE, Kossova GV, Chepurnov SA, Iniushkin AN, Goncharov OB (2003) Neuropeptide thyroliberin in ultra low doses—anticonvulsant defense of the brain. Radiats Biol. Radioecol 43: 324—327. (In Russ)].
- 24. *Марков АГ* (1991) Изучение продолжительности кормлений и перерывов между ними у мышей в период установившейся лактации. Физиол журн СССР им ИМ Сеченова. 77: 142—148. [Markov AG (1991) The duration of feedings and the intervals between them in mice during established lactation. Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova 77: 142—148. (In Russ)].
- 25. *Марков АГ*, *Ландграф P* (1989) Особенности поведения детенышей мыши при сосании. Уровень окситоцина в крови самок при кормлении. Физиол. журн. СССР им ИМ Сеченова 75: 1089—1094. [*Markov AG*, *Landgraf R* (1989) Behavioral characteristics of mouse pups during suckling. The oxytocin level in the blood of females during nursing. Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova 75: 1089—1094. (In Russ)].
- Yoneda N, Irahara M, Saito S, Uemura H, Aono T (1995) Usefulness of recombinant human prolactin for treatment of poor puerperal lactation in a rat model. Eur J Endocrinol 133(5): 613–617. https://doi.org/10.1530/eje.0.1330613
- Bachmann O, Heinzmann A, Mack A, Manns MP, Seidler U (2007) Mechanisms of secretionassociated shrinkage and volume recovery in cultured rabbit parietal cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292: G711–G717. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00416.2006
- 28. Markov AG, Falchuk EL, Kruglova NM, Rybalchenko OV, Fromm M, Amasheh S (2014) Comparative analysis of theophylline and cholera toxin in rat colon reveals an induction of sealing tight junction proteins. Pflugers Arch 466(11): 2059–2065. https://doi.org/10.1007/s00424-014-1460-z
- 29. Alekseev NP (2021). Physiology of human female lactation. Springer.
- Scott N, Prigge M, Yizhar O, Kimchi T (2015) A sexually dimorphic hypothalamic circuit controls maternal care and oxytocin secretion. Nature 525: 519

 –522. https://doi.org/10.1038/nature15378
- 31. Bravo PJ, Hoy, LJ, Uribe R-M, Charli J-L (2015) 60 years of neuroendocrinology: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. J Endocrinol 226: T85-N100. https://doi.org/10.1530/JOE-15-0124
- 32. *Чернышева МП, Ноздрачев АД* (2017) Нейроэндокринный гипоталамус как гомеостат эндогенного времени. Журн эволюц биохим физиол им ИМ Сеченова 53: 3–15. [*Chernysheva MP, Nozdrachev AD* (2017) Neuroendocrine hypothalamus as a homeostat of endogenous time. Zh Evol Biokhim Fiziol 53: 3–15. (In Russ)].
- Bridge RS (2015) Neuroendocrine regulation of maternal behavior. Front Neuroendocrinol 36: 178–196. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.007

- 34. *Инюшкин АН* (2002) Влияние тиреолиберина на мембранный потенциал и паттерн спонтанной дыхательной активности нейронов дыхательного центра in vitro у крыс. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 88: 1467—1476. [*Iniushkin AN* (2002) Effect of thyroliberin on membrane potential and pattern of spontaneous activity of neurons of the respiratory center in rats in vitro. Russ J Physiol 88: 1467—1476. (In Russ)].
- Dulac C, O'Connell LA, Wu Z (2014) Neural control of maternal and paternal behaviors. Science 345: 765–770. https://doi.org/10.1126/science.1253291
- 36. *Insel TR*, *Harbaugh CR* (1989) Lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior. Physiol Behav 45: 1033–1041. https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90234-5
- 37. Bendesky A, Kwon YM, Lassance JM, Lewarch CL, Yao S, Peterson BK, He MX, Dulac C, Hoekstra HE (2017) The genetic basis of parental care evolution in monogamous mice. Nature. 544: 434–439. https://doi.org/10.1038/nature22074
- 38. Wu Z, Autry AE, Bergan JF, Watabe-Uchida M, Dulac CG (2014) Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. Nature 509: 325–330. https://doi.org/10.1038/nature13307
- 39. *Dobolyi A* (2011) Novel potential regulators of maternal adaptations during lactation: tuberoinfundibular peptide 39 and amylin. J Neuroendocrinol 23: 1002–1008. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02127.x

Is Thyroliberin an Integrator of Prolactin- and Oxytocin-Dependent Processes in the Breast and Parental Behavior during Lactation in Mice?

A. G. Markov^a, *, L. V. Shadrin^b, N. M. Kruglova^a, A. A. Fedorova^a, I. A. Razgovorova^a, and M. P. Chernysheva^a

^a Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia
 ^b University Department of Physical Culture and Sports, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: a.markov@spbu.ru

Feeding a female offspring with a secretion of the mammary gland is a hallmark of mammals. Determination of the contribution of neuropeptides to the neuroendocrine regulation of mammary gland functions and parental behavior in mammals and humans is a priority for understanding these processes. Since in lactating females the stimulus to suckling by pups induces burst secretion of prolactin, oxytocin, and thyroliberin, the study investigates the possibility of the effect of thyroliberin on prolactin-dependent lactogenesis and oxytocin-mediated reflexes of milk excretion, as well as on components of maternal behavior. It was found that bilateral intranasal infusions of thyroliberin in lactating female mice specifically facilitate, in comparison with control, lactation behavior, but not food or drink. Tiroliberin increased the duration of the feeding periods and the number of milk withdrawal reflexes in response to sucking of the pups, while simultaneously increasing the duration of the intervals between them. Light-optical and electron microscopic studies showed a significant change in the epithelial cells of the alveoli of the mammary glands, indicating an increase in the synthesis of components and the volume of milk under the influence of the tripeptide. This is confirmed by the higher rate of body weight growth in the mice and their better survival compared to the control. The absence after chronic infusions of thyroliberin in low doses of changes in the concentration of thyroxine and triiodothyronine in the blood plasma of females, determined by enzyme immunoassay, indicates the invariability of their thyroid status. We assume that thyroliberin is included in the coordination of the mechanisms of the formation of the pattern of the neuroendocrine milk ejection reflex, behavioral acts on the part of the female, and the enhancement of synthetic activity in the mammary gland.

Keywords: lactation, thyroliberin, maternal behavior, lactation behavior, milk ejection reflex

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

РЕОРГАНИЗАЦИЯ СЕТИ ИНТЕРНЕЙРОНОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ПАРВАЛЬБУМИН, В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

© 2021 г. Л. И. Хожай^{1, *}, В. А. Отеллин¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: astarta0505@mail.ru

> Поступила в редакцию 20.05.2021 г. После доработки 30.06.2021 г. Принята к публикации 05.07.2021 г.

Известно, что популяция тормозных ГАМКергических интернейронов неоднородна и состоит из нескольких субпопуляций нейронов, имеющих разное функциональное назначение. Одной из них является субпопуляция нейронов, экспрессирующих кальций-связывающий белок парвальбумин и влияющих на синхронную импульсную активность основных пирамидных нейронов. Целью исследования было изучить реакцию интернейронов неокортекса, экспрессирующих парвальбумин, на воздействие гипоксии в неонатальный период и оценить нейропротективные свойства фенибута (гидрохлорида гамма-амино-бета-фенилмасляной кислоты), ноотропного препарата, производного ГАМК. Воздействие гипоксии осуществляли в камере с дыхательной смесью, содержащей 7.8% кислорода. Выявление нейронов, содержащих парвальбумин, проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител к парвальбумину. Исследование сенсомоторной области неокортекса осуществляли на 10-е постнатальные сутки (П10). Показано, что к концу неонатального периода ($\Pi 10$) в неокортексе у контрольных животных присутствует значительная по численности субпопуляция нейронов, экспрессирующих парвальбумин, представленная двумя типами клеток. Наибольшая их локализация выявлена в верхних и средних слоях неокортекса (II-IV и слое V). После воздействия перинатальной гипоксии во всех слоях коры численность нейронов, экспрессирующих парвальбумин, значительно сокращалась: в слое ІІ в 1.4 раза; в слоях III и IV в 2.4 раза; в глубоких слоях: в слое V в 1.9 раза; в слое VI в 1.4~(p < 0.05). Применение фенибута в терапевтической дозе сразу после воздействия гипоксии нивелировало эти нарушения. Во всех слоях неокортекса у животных, переживших воздействие гипоксии, число нейронов, экспрессирующих парвальбумин, увеличивалось и соответствовало контрольным значениям. Полученные данные свидетельствуют о том, что воздействие гипоксии снижает численность нейронов, экспрессирующих парвальбумин, и дают основание предполагать, что в неонатальный период после воздействия гипоксии фармакологический препарат фенибут может оказывать нейропротективное действие на клетки этой субпопуляции тормозных интернейронов.

Ключевые слова: неонатальный период, перинатальная гипоксия, ГАМК, парвальбумин, фенибут

DOI: 10.31857/S0869813921100125

ВВЕДЕНИЕ

Развитие и становление неокортекса у млекопитающих и человека является одним из важных и сложных процессов, происходящих в онтогенезе. В неокортексе

человека формируются структурные и функциональные механизмы речи, мышления, сенсорных ответов и других когнитивных реакций. В состав коры головного мозга входят разные типы нейронов, каждый из которых обладает специфическими молекулярными и функциональными характеристиками [1].

Особый статус имеют тормозные ГАМКергические интернейроны, регулирующие активность отдельных популяций пирамидных нейронов неокортекса. Известно, что большинство (приблизительно 70%) корковых нейронов являются пирамидными клетками, а 20—30% от общего количества неокортикальных нейронов представляют тормозные ГАМКергические интернейроны [1, 2] Популяция ГАМКергических интернейронов неоднородна и состоит из нескольких субполуляций, имеющих разное функциональное назначение и различные молекулярные механизмы регуляции. Отдельные подтипы ГАМКергических интернейронов содержат кальций-связывающие белки (парвальбумин, кальбиндин и кальретинин, т.е. белки, колокализующиеся с ГАМК) и являются главными буферами кальция в нейронах [1—7]. В настоящее время известно, что кальций-связывающий белок парвальбумин играет важную роль во многих физиологических процессах, влияет на процессы возбуждения и синхронную импульсную активность основных пирамидных нейронов [5].

Известно, что повреждение тормозных механизмов ГАМКергической передачи вызывает гиперактивацию и гиперсинхронизацию нейронов в сети [5], а нарушение функции интернейронов, экспрессирующих парвальбумин, приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний, таких как синдром Туретта, болезнь Паркинсона, шизофрения, эпилепсия, аутизм т.д. [8, 9].

Одним из значимых повреждающих факторов в неонатальный период является гипоксия/ишемия. Повреждения головного мозга после воздействия гипоксии в этот период относят к основным причинам детской смерти. Значительная часть новорожденных, перенесших тяжелую гипоксию/ишемию в неонатальный период, имеет психоневрологические расстройства различной степени тяжести с последующей инвалидизацией [10].

Установлено, что перинатальная гипоксия оказывает повреждающее действие на ГАМКергические интернейроны неокортекса, вызывая сокращение их численности, снижение экспрессии рецепторных белков к ГАМК. При этом, учитывая физиологическую важность субпопуляции ГАКМергических интернейронов, экспрессирующих парвальбумин, до сих пор неизвестно, какова их реакция на воздействие гипоксии в неонатальный период.

Несмотря на хорошо известный факт о том, что гипоксия в ранний период развития является мощным повреждающим фактором, в настоящее время отсутствуют средства для фармакологической коррекции последствий воздействия перинатальной гипоксии на мозг. Поэтому, поиск и разработка высокоэффективных средств для коррекции этих повреждений является одной из актуальных задач современной фармакологии.

Установлено, что некоторые препараты производные ГАМК в условиях гипоксии могут оказывать антигипоксическое действие и активировать ферменты антиоксидантной защиты [11, 12]. Одним из них является ноотропный препарат фенибут, синтезированный на основе ГАМК, действующим веществом которого является гидрохлорид гамма-амино-бета-фенилмасляной кислоты. В настоящее время неизвестно, существует ли возможность применения фенибута в неонатальный период для коррекции выявленных структурных нарушений в неокортексе после воздействия гипоксии.

В связи с этим, целью исследования было изучить реакцию интернейронов неокортекса, экспрессирующих парвальбумин, на воздействие гипоксии в неонатальный период у крыс и оценить нейропротективные свойства фенибута.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на лабораторных крысах линии Вистар из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Соблюдение этических стандартов. Все процедуры с животными проводились в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных" и при соблюдении требований Совета Европейского сообщества (86/609/EEC) об использовании лабораторных животных. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Воздействие гипоксии. Воздействие общей острой гипоксии на новорожденных крыс осуществляли в специальной камере в течение 1 ч при содержании в дыхательной смеси: кислорода — 7.6—7.8%; углекислого газа — 0.15—0.21%; азота — 91.8%, при температуре 21.3— 23° С и нормальном общем атмосферном давлении (760 мм рт. ст.). Воздействие гипоксии проводилось на 2-е постнатальные сутки (модель недоношенной беременности человека).

В работе использовали 3 группы животных: 1) крысы, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии; 2) крысы, подвергавшиеся воздействию гипоксии и получавшие фенибут; 3) контрольные животные того же возраста, получавшие инъекции физиологического раствора. Каждая группа содержала по 8—10 животных, отобранных из разных пометов. Исследовали сенсомоторную область неокортекса на 10-е постнатальные сутки (П10), т.е. в конце неонатального периода. (Известно, что сенсомоторная область неокортекса получает и обрабатывает сигналы от чувствительных периферических рецепторов, проводит сигналы в таламические структуры и спинной мозг. Эта область неокортекса является местом инициации основного двигательного ответа и активации двигательного поведения).

Головной мозг извлекали и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) в течение 24 ч, заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6-7 мкм на уровне брегмы -1.80-2.04 мм [13]. Затем срезы помещали на предметные стекла Super-Frost Plus Gold (Menzel-Glaser, Германия).

Применение фенибута. Для попытки фармакологической коррекции выявленных структурных нарушений в неокортексе было использовано лекарственное средство фенибут (бета-фенил гамма-аминомасляной кислоты гидрохлорид) отечественный препарат, синтезированный на основе ГАМК. Фенибут — ноотропный препарат, применяемый при тревожных состояниях, психопатических нарушениях, неврозах, патологической гиперактивности у детей и т.д. Фенибут вводили подкожно 1 раз в сутки в терапевтической дозе 15 мг/кг в течение 10 сут, т.е. в течение всего неонатального периода.

Иммуногистохимическое исследование. Иммуногистохимическую реакцию на парвальбумин проводили с использованием кроличьих поликлональных антител (Anti-Parvalbumin antibody (ab11427), Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 100. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (pH 6.1, Dako, Дания) в течение 25 мин срезы инкубировали в первичных антителах при 4°С в течение 18 ч. В качестве вторичных антител использовали реактивы из набора EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Срезы помещались во вторичные антитела на 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла и заключали в синтетическую заливочную среду Регмаинt (Тегто, США). При проведении иммуногистохимической реакции все процеду-

Таолица 1. Изм	енение на стадии 1110 чис	сленности неиронов, эксп	рессирующих парвальбу-			
мин, в разных слоях неокортекса у крыс в контроле, после воздействия перинатальной гипо-						
ксии и воздействия гипоксии совместно с получением фенибута (число клеток на условной						
единице площади)						
			D v			

Слои неокортекса	Контроль	Воздействие гипоксии	Воздействие гипоксии + фенибут	
II	26.4 ± 4.7	18.3 ± 3.2	20.8 ± 2.4	
III–IV	29.6 ± 4.3	12.4 ± 5.1*	$24.6 \pm 3.1*$	
V	21.5 ± 3.6	$11.6 \pm 1.3 \#$	$18.1 \pm 1.9 \#$	
VI	10.2 ± 2.7	7.5 ± 2.2	8.4 ± 1.8	

^{*}, # — различия достоверны при p < 0.05.

ры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов, полученных от контрольных и подопытных животных. Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Статистическая оценка результатов исследования. Подсчет иммуно-положительных клеток, имеющих иммунную окраску цитоплазмы и отростков, проводили на цифровых изображениях, полученных с гистологических препаратов фронтальных срезов мозга на условной единице площади равной 0.1 мм², выбранной в центральной части каждого слоя, при увеличении объектива ×20. Численный анализ данных осуществляли на цифровых изображениях, полученных с 10-12 гистологических срезов мозга, взятого от 5-6 животных каждой исследуемой группы при помощи компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0. Измерения размеров клеточных тел проводили на цифровых изображениях серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия) при увеличении объектива ×100. Статистически обработанные данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Для анализа и сравнения межгрупповых различий между средними значениями полученных показателей использовали *t*-критерий Стъюдента и oneway ANOVA. Различия считали статистически значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на стадии $\Pi10$ (поздний неонатальный период). У контрольных животных в верхних слоях неокортекса II, III—IV и слое V на условной единице площади присутствует большое число клеток, иммунопозитивных на парвальбумин, при этом в слое VI их число значительно ниже (табл. 1). Иммунопозитивные на парвальбумин нейроны отличаются по форме клеточного тела, они имеют или мультиполярную, или веретеновидную форму. Иммунопозитивные на парвальбумин нейроны по размеру клеточных тел представлены двумя группами: крупными клетками (у которых площадь клеточного тела в среднем составляла 1915.3 мкм^2) и клетками меньшего размера и (у которых площадь клеточного тела в среднем составляла 1267.0 мкм^2) (табл. 2) (рис. 1d).

У крыс, подвергавшихся воздействию перинатальной гипоксии, к концу неонатального периода во всех слоях неокортекса число нейронов, иммунопозитивных на парвальбумин, значительно снижалось по сравнению с контрольными значениеми: в слое II в 1.4 раза; в слоях III—IV в 2.4 раза; в слое V в 1.9 раза; однако в слое VI число клеток не изменялось (при p < 0.05) (табл. 1) (рис. 1a, b). Следует отметить,

Таблица 2. Размеры клеточных тел нейронов, экспрессирующих парвальбумин, в неокортексе у крыс в контроле, после воздействия перинатальной гипоксии и воздействия гипоксии совместно с получением фенибута (в мкм²)

Размер клеток	КП10	ГП10	ГП10 + фенибут	
Площадь тела крупных клеток	1970.2 ± 218.4	1874.8 ± 258.4	1901.3 ± 239.7	
Площадь тела мелких клеток	1319.6 ± 176.2	1354.6 ± 162.6	1126.7 ± 204.4	

 $K\Pi 10$ — контроль, 10-е постнатальные сутки; $\Gamma\Pi 10$ — после воздействия гипоксии, 10-е постнатальные сутки; $\Gamma\Pi 10$ +фенибут — после воздействия гипоксии и применения фенибута, 10-е постнатальные сутки.

что форма и размеры клеточных тел нейронов, иммунопозитивных на парвальбумин, соответствуют таковым у контрольных животных (табл. 2) (рис. 1d, e).

У крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии и получавших фенибут, число иммуноположительных клеток резко возрастает по сравнению со значениями у животных, подвергавшихся гипоксии (рис. 1a-c). Значимое повышение численности интернейронов, иммунопозитивных на парвальбумин, имеет место в слоях III—IV и слое V (табл. 1). В слоях III—IV число клеток увеличивается почти в 2 раза, а в слое V в 1.6 раза по сравнению со значениями предыдущей серии экспрепиментов. В слое VI число клеток, иммунопозитивных на парвальбумин, почти соответствует его значению в предыдущей серии опытов. Форма и размеры клеточных тел нейронов, иммунопозитивных на парвальбумин, соответствуют таковым у контрольных животных и у крыс подвергавшихся воздействию перинатальной гипоксии (табл. 2) (рис. 1d, e).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Во всех слоях неокортекса млекопитающих, достигших половозрелого возраста, присутствуют тормозные ГАМКергические интернейроны, где они являются постоянным компонентом локальных тормозных межнейронных цепей [1]. Одна из субпопуляций ГАМКергических интернейронов, экспрессирующих кальций-связывающий белок парвальбумин, представляет главный подтип корковых ГАМКергических интернейронов, специализированных на обеспечение быстрого перисоматического торможения основных пирамидных нейронов [5].

Установлено, что во взрослом неокортексе парвальбумин экспрессируют 20-25% клеток от общего числа ГАМКергических интернейронов [14, 15]. Они представлены двумя типами клеток: корзинчатыми клетками (большими и малыми) и клетками-канделябрами. Большие и малые корзинчатые интернейроны имеют мультиполярную или веретеновидную форму клеточного тела и радиально расходящиеся дендриты. Их аксоны дают начало многим длинным горизонтально и вертикально ориентированным коллатералям. Установлено, что большие корзинчатые клетки являются основным источником горизонтального торможения в пределах слоя своей локализации. Их боковые аксональные коллатерали формируют перисоматическое торможение, образуя корзинки вокруг клеточных тел соседних нейронов, в том числе и ГАМКергических. Кроме того, это единственные тормозные интернейроны, имеющие контакты с возбуждающими таламическими волокнами [1]. Клетки-канделябры также имеют мультиполярную или овальную форму клеточного тела, обширно ветвящиеся аксональные претерминальные сегменты, которые формируют короткие вертикально ориентированные ряды терминальных коллатералей, иннервирующих только начальные сегменты аксонов пирамидальных клеток, эти клетки никогда не иннервируют другие интернейроны [1]. Показано, что во взрослом мозге эти интернейроны в большем количестве встречаются в средних кортикальных слоях [14, 15]

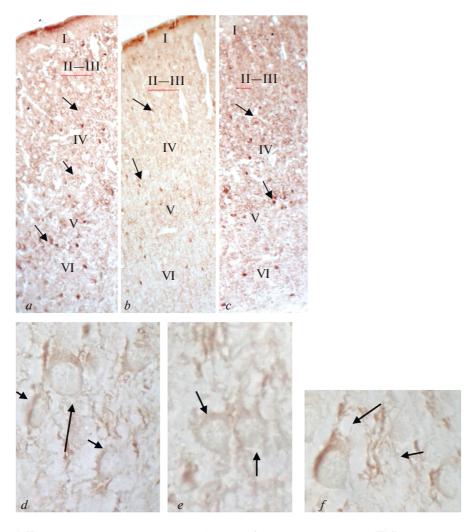


Рис. 1. Неокортекс крысы, сенсомоторная область на 10-е постнатальные сутки (П10); иммуногистохимическая реакция на парвальбумин, иммуноположительные клетки (стрелки).

- a контроль;
- b после воздействия перинатальной гипоксии;
- c после воздействия гипоксии и применения фенибута;
- d слой V, контроль, иммуноположительные нейроны большого размера (длинная стрелка) и меньшего размера (короткие стрелки);
- e слой V, после воздействия перинатальной гипоксии, иммуноположительные нейроны (длинная стрелка);
- f— слой V, после воздействия перинатальной гипоксии и применения фенибута, иммуноположиельные нейроны большого размера (длинная стрелка) и меньшего размера (короткая стрелка).
- Увел.: (a, b, c) об. $\times 10$; (e, d, f) об. $\times 100$.

Результаты исследования показали, что к концу неонатального периода (стадия П10) в неокортексе контрольных животных присутствует значительная по численности субпопуляция нейронов, экспрессирующих парвальбумин, представленная двумя типами клеток, отличающихся по размеру клеточных тел. Наибольшая их локали-

зация оказалась в верхнем и средних слоях II, III—IV и слое V (табл. 1), что согласуется с наблюдениями, полученными при исследовании взрослого неокортекса [14, 15], и свидетельствует о том, что в неонатальном периоде уже существует субпопуляция нейронов, экспрессирующих парвальбумин, представленная двумя типами клеток, различающихся по размеру.

Полученные данные показали, что после воздействия перинатальной гипоксии во всех слоях коры численность нейронов, экспрессирующих парвальбумин, значительно сокращается, особенно в средних слоях III—IV и слое V: в слое II в 1.4 раза; в слоях III—IV в 2.4 раза; в глубоких слоях: в слое V в 1.9 раза; в слое VI в 1.4. При этом размер клеточных тел по сравнению с таковым в контроле не изменяется. Результаты показали, что применение в неонатальный период фенибута в терапевтической дозе нивелирует нарушения, вызванные воздействием гипоксии. Во всех слоях неокортекса число нейронов, экспрессирующих парвальбумин, почти соответствует контрольным значениям (различия значений в контроле и после воздействия гипоксии с применением фенибута не достоверны) (табл. 1). Эти данные дают основание предполагать, что фенибут оказывает нейропротективное действие на интернейроны, содержащие парвальбумин, хотя механизм этого эффекта пока неясен.

Молекулярные и структурные механизмы гипоксического повреждения клеток головного мозга млекопитающих изучались многими исследователями [16-18] и продолжают изучаться до сих пор. Согласно полученным данным работ, выполненных на различных экспериментальных моделях, центральное место в повреждении клеток головного мозга при развитии острой гипоксии любой этиологии принадлежит: 1) прогрессирующим нарушениям ионного гомеостаза, 2) глутаматергической сигнальной трансдукции и 3) окислительному стрессу [18–20]. Существующая в настоящее время гипотеза кальций-зависимого повреждения нервных клеток предполагает, что острая гипоксия мозга приводит к резкому увеличению диффузного нерегулируемого перемещения ионов калия из клетки в межклеточное пространство, а ионов натрия, кальция и хлора — в цитоплазму клетки по градиенту концентрации, вызывающего длительную деполяризацию мембраны нейронов [21]. Считается, что чрезмерный транспорт Са²⁺ в клетку с участием NMDA- и AMPAрецепторов является главным токсическим воздействеим глутамата, с участием которого также начинается целый каскад повреждающих процессов [22-24]. Также высокое содержание ионов кальция вызывает стимуляцию NO-синтазы и увеличение образования NO. Активация NADPH-оксидазы при действии гипоксии образует большое количество супероксидных радикалов, и в результате кальциевый стресс способствует развитию оксидативного и нитрозативного стресса. Конечно, существуют и другие факторы, повреждающее действие которых запускается при воздействии гипоксии. Что касается выявленных нейропротективных свойств фенибута, который является веществом, производным ГАМК, то в настоящее время можно лишь упомянуть о его антиоксидантном свойстве, показанном в ряде исследований [11, 12, 26]. Пока трудно определить этап, на котором фенибут может встраиваться в активированные гипоксией повреждающие процессы и оказывать протективное действие на ГАМКергические нейроны. Для этого необходимы лальнейшие исслелования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты показали, что в неонатальный период в неокортексе крыс присутствует значительная субпопуляция нейронов, экспрессирующих парвальбумин. Наибольшая локализация этих клеток выявляется в верхнем и средних слоях. Воздействие острой перинатальной гипоксии приводит к резкому снижению численности нейронов, экспрессирующих парвальбумин, во всех слоях неокортекса.

Применение фенибута в течение неонатального периода нивелирует повреждающее действие гипоксии и способствует сохранению численности этой субпопуляции нейронов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052/21).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАЛ АВТОРОВ

В.А.О. и Л.И.Х. – обоснование и планирование исследования, Л.И.Х. – проведение экспериментов, анализ полученных результатов, написание текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Druga R* (2009) Neocortical Inhibitory System (cortical interneurons/GABAergic neurons/calcium-binding proteins/neuropeptides). Folia Biol (Praha) 55: 201–217.
- Jones EG (1975) Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. J Comp Neurol 160: 205–267.
 Eggermann E, Jonas P (2011) How the 'slow' Ca²⁺ buffer parvalbumin affects transmitter release
- Eggermann E, Jonas P (2011) How the 'slow' Ca²⁺ buffer parvalbumin affects transmitter release in nanodomain-coupling regimes. Nat Neurosci 15: 20–22. https://doi.org/10.1038/nn.3002
- 4. *Turovsky EA, Turovskaya MV, Kononov AV, Zinchenko VP* (2013) Shortterm episodes of hypoxia induce posthypoxic hyperexcitability and selective death of GABAergic hippocampal neurons. Exp Neurol 250: 1–7. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.006
- 5. Зинченко ВП, Туровская МВ, Теплов ИЮ, Бережнов АВ, Туровский ЕА (2016) Роль парвальбумин-содержащих интернейронов в регуляции спонтанной синхронной активности нейронов мозга в культуре. Биофизика 61: 102—111 [Zinchenko VP, Turovskaya MV, Teplov IY, Berezhnov AV, Turovsky EA (2016) The role of parvalbumin-containing interneurons in the regulation of spontaneous synchronous activity of brain neurons in vitro. Biophysics 61: 102—111. (In Russ)].
- 6. *Kawaguchi Y, Kondo S* (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers form specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. J Neurocytol 31: 277–287.
 - https://doi.org/10.1023/a:1024126110356
- 7. *Kawaguchi Y, Kubota Y* (1993) Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin and calbindin D28k-immunoractive neurons in layer V of rat frontal coztex. J Neurophysiol 70: 387–396. https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.1.387
- 8. *Houser C* (1991) GABA neurons in seizure disorders: a review of immunocytochemical studies. Neurochem Rev 16: 295–308. https://doi.org/10.1007/BF00966093
- 9. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 5: 793–807. https://doi.org/10.1038/nrn1519
- 10. Rees S, Harding R, Walker D (2011) The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. Int J Dev Neurosci 29: 551–563. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.04.004
- 11. Тюренков ИН, Перфилова ВН, Попова ТА, Иванова ЛБ, Прокофьев ИИ, Гуляева ОВ, Штепа ЛИ (2013) Изменение оксидантного статуса у самок с экспериментальным гестозом
 под влиянием производных ГАМК. Бюлл экспер биол мед 155: 340—344. [Tyurenkov IN,
 Perfilova VN, Popova TA, Ivanova LB, Prokofiev II, Gulyaeva OV, Shtepa LI (2013) Changes in
 oxidative status in females with experimental gestosis under the influence of GABA derivatives.
 Bull Exper Biol Med 155: 340—344.(In Russ)].
- 12. Попова А, Перфилова ВН, Жакупова ГА, Веровский ВЕ, Островский ОВ, Тюренков ИН (2016) Влияние сулодексида на функциональное состояние митохондрий плеценты самок крыс с экспериментальной преэклампсией. Биомед химия 62: 572—576. [Popova A, Perfilova VN, Zhakupova GA, Verovsky VE, Ostrovsky OV, Tyurenkov IN (2016) Influence of

- sulodexide on the functional state of mitochondria in the placenta of female rats with experimental preeclampsia. Biomed Chem 62: 572–576. (In Russ)].
- 13. Paxinos G, Watson C (1998) The Rat Brain in stereotaxic coordinates. London: Press.
- 14. *Gabbott PL, Bacon SJ* (1996) Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a, b, c, 25 and 32) in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. Compar Neurol 364: 567–608.
 - https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364:4<567::AID-CNE1>3.0.CO;2-1
- 15. Zaitsev AV, Gonzalez-Burgos G, Povysheva NV, Kröner S, Lewis DA, Krimer LS (2005) Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. Cereb Cortex 15:1178—1186. https://doi.org/10.1093/cercor/bhh218
- Lewén A, Matz P, Chan PHJ (2000) Free radical pathways in CNS injury. Neurotrauma 17: 871–890. https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.871
- 17. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GSJ (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. Neurol Sci 179: 1–33. https://doi.org/10.1016/s0022-510x(00)00386-5
- 18. *Heiss WD* (2012) The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? Ann N Y Acad Sci 1268: 26–34. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06668.x
- Shouman BO, Mesbah A, Aly H (2008) Iron metabolism and lipid peroxidation products in infants with hypoxic ischemic encephalopathy. J Perinato 28: 487–491. https://doi.org/10.1038/jp.2008.22
- 20. Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M (2006) Mechanisms of injury to the newborn brain. Clin Perinatol 33: 573–591. https://doi.org/10.1016/j.clp.2006.06.012
- 21. *Thibault O, Gant JC, Landfield PW* (2007) Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. Aging Cell 6: 307–317. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00295.x
- 22. Verkhratsky A, Toescu ECJ (2003) Endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis and neuronal death. Cell Mol Med 7: 351–361. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00238.x
- 23. *Tauskela JS, Morley P* (2004) On the role of Ca²⁺ in cerebral ischemic preconditioning. Cell Calcium 36: 313–322. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.02.008
- 24. *Distefano G, Praticò AD* (2010) Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Ital J Pediatr 16: 36–63. https://doi.org/10.1186/1824-7288-36-63
- Tyurenkov IN, Perfilova VN, Sadikova NV (2014) Change of cardiac ino- and chronotropic functions in stressed animals with blockade of different NO-synthases. Vestn Ross Acad Med Nauk 1–2: 46–50.

https://doi.org/10.15690/vramn.v69i1-2.941

Reorganization of a Network of Interneurons Expressing Parvalbumin in the Rat's Neocortex after Perinatal Hypoxia and the Possibility of Its Pharmacological Correction

L. I. Khozhai^{a, *} and V. A. Otellin^a

^a Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia * e-mail: astarta0505@mail.ru

It is known that the population of inhibitory GABAergic interneurons is heterogeneous and consists of several subpopulations of neurons with different functional purposes. One of them is a subpopulation of neurons expressing the calcium-binding protein parvalbumin and affecting the synchronic impulse activity of the main pyramidal neurons. The aim of the study was to study the response of neocortex interneurons expressing parvalbumin to the effects of hypoxia in the neonatal period and to evaluate the neuroprotective properties of Phenibut (gamma-amino-beta-phenylbutyric acid hydrochloride), a nootropic drug derived from GABA. The exposure to hypoxia was carried out in a chamber with a breathing mixture containing 7.8% oxygen. The detection of neurons containing parvalbumin was carried out using primary rabbit polyclonal antibodies to

parvalbumin. The study of the sensorimotor area of the neocortex was carried out on postnatal day 10 (P10). It was shown that by the end of the neonatal period (P10) in the neocortex of control animals there is a significant subpopulation of neurons expressing parvalbumin, represented by two types of cells. Their greatest localization was found in the upper and middle layers of the neocortex (II–IV and layer V). After exposure to perinatal hypoxia, the number of neurons expressing parvalbumin in all layers of the cortex was significantly reduced: in layer II, by 1.4 times; in layers III and IV, 2.4 times; in deep layers: 1.9 times in layer V; in layer VI at 1.4 (p < 0.05). The use of drug Phenibut in a therapeutic dose immediately after exposure to hypoxia leveled these disorders. In all layers of the neocortex in animals that survived exposure to hypoxia, the number of neurons expressing parvalbumin increased and corresponded to control values. The data obtained indicate that exposure to hypoxia reduces the number of neurons expressing parvalbumin, and suggest that in the neonatal period after exposure to hypoxia, the pharmacological drug Phenibut may have a neuroprotective effect on the cells of this subpopulation of inhibitory interneurons.

Keywords: neonatal period, perinatal hypoxia, GABA, parvalbumin, phenibut

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЭГ И УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ ИСПЫТУЕМЫХ С РАЗНОЙ УСПЕШНОСТЬЮ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПСИХОМОТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПРИ ПРОБУЖДЕНИИ ВО ВРЕМЯ ДНЕВНОГО СНА

© 2021 г. Е. А. Черемушкин^{1, *}, Н. Е. Петренко¹, В. Б. Дорохов¹

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия * E-mail: khton@mail.ru

> Поступила в редакцию 20.05.2021 г. После доработки 09.07.2021 г. Принята к публикации 23.07.2021 г.

У взрослых здоровых испытуемых с разным уровнем тревожности исследовалась эффективность восстановления монотонной деятельности после непродолжительного эпизода дневного сна. Использовался непрерывно-дискретный психомоторный тест, при выполнении которого участники эксперимента осуществляли два последовательно чередующихся задания: счет "про себя" от 1 до 10, сопровождаемый синхронными нажатиями на кнопку правой рукой, и только счет "про себя", без нажатий. В течение всего опыта глаза у испытуемых были закрыты. Перед засыпанием все правильно выполняли задания теста. У тех из них, кто после пробуждения стал ошибаться в числе нажатий и существенно медленнее выполнять тест, показано увеличение спектральной мощности дельта-, тета- и альфаколебаний в ЭЭГ. Этот результат указывает на выраженные признаки инершии сна. в условиях которой осуществлялась деятельность. У группы испытуемых, которые точно воспроизводили задания теста в обеих экспериментальных ситуациях, после пробуждения изменения в дельта-, тета- и альфа-1 спектральных диапазонах ЭЭГ по сравнению с периодом начала опыта не обнаружено. Этот факт, а также то обстоятельство, что скорость выполнения теста уменьшилась незначительно, дает основания полагать, что последствия кратковременного сна в меньшей степени повлияли на выполнение ими психомоторного теста. Снижение мощности альфа-2-колебаний в каудальных областях отведения ЭЭГ, как мы считаем, отражает активационные процессы, обеспечивающие более эффективную деятельность в этих условиях. Непродолжительный дневной сон неодинаково влияет на эффективность восстановления деятельности здоровых испытуемых с разным уровнем тревожности. После пробуждения у субъектов с повышенной тревожностью в большей степени проявляются признаки инерции сна, и они хуже выполняют задания психомоторного теста, чем в начале опыта, перед засыпанием. Влияние кратковременного сна на эффективность выполнения теста у менее тревожных испытуемых выражено значительно слабее.

Ключевые слова: дневной сон, пробуждение, инерция сна, восстановление деятельности, тревожность, ЭЭГ

DOI: 10.31857/S0869813921100034

Нейрофизиологические исследования восстановления деятельности после сна дают важную информацию о мозговых механизмах ее осуществления в условиях сниженного уровня сознания, расширяют наши представления о работе мозга и представляют интерес в практическом отношении. Эти исследования проводятся в

рамках представлений об инерции сна — когнитивно-поведенческого коррелята сложного и постепенного перехода от состояния сна к состоянию бодрствования, атрибутом которого является временное снижение работоспособности [1]. Обычно оцениваются поведенческие показатели восстановления деятельности: скорость и точность выполнения заданий [обзоры: 1, 2]. В отдельных работах изучаются изменения биоэлектрической активности после ночного сна [3—5]. Исследования, использующие нейрофизиологические показатели во время выполнения деятельности в этот период, малочисленны. В работе [6] было обнаружено, что депривация ухудшает показатели эффективности и время реакции при выполнении Струп-теста. При этом, независимо от длительности ночного сна, наблюдается рост альфаактивности в ЭЭГ, а мощность тета-колебаний увеличивается только у испытуемых с частичной депривацией.

Влияние дневного сна на эффективность деятельности не столь однозначно и зависит от ряда факторов. В частности, показано улучшение выполнения экспериментальных заданий после кратковременных периодов сна, а именно - менее получаса; при пробуждении из менее глубоких, чем третья, стадий сна, а также при самопроизвольном, а не вынуждаемом внешними обстоятельствами пробуждении [обзоры 7, 8]. Полученные факты делают представления об инерции сна как однозначно отрицательном явлении предметом дискуссии. Положительное воздействие короткого дневного сна на деятельность получило название "power nap" [9]. Исследования одновременно поведенческих и нейрофизиологических характеристик в этих условиях практически отсутствуют. Показано снижение мощности альфа-ритма ЭЭГ в состоянии покоя с открытыми глазами после 20 мин дневного сна [10]. Методами ЭЭГ и фМРТ исследовались спектральные характеристики биопотенциалов и связность отделов мозга в процессе выполнения когнитивной деятельности после пробуждения [11]. Подтвердилось, что чем длительнее и глубже сон перед пробуждением, тем менее эффективна последующая деятельность (выполнение задач на вычитание по убыванию). При этом мощность альфа-колебаний возрастала, а связность между отделами мозга уменьшалась по сравнению с периодом перед сном.

Влияние на сон индивидуальных характеристик человека оценивается главным образом с медицинской точки зрения и касается его нарушений [12, 13]. У нормотипических людей была показана связь личностных особенностей, таких как низкий уровень нейротизма, экстраверсия и эмоциональная стабильность, с лучшим качества сна [14—16]. Влияние тревожности на деятельность после пробуждения практически не изучалось.

Цель нашего исследования: изучить нейрофизиологические корреляты эффективности восстановления деятельности в условиях, приближенных к реальной ситуации засыпания днем, самопроизвольного пробуждения и необходимости сразу выполнять работу, предписанную ранее инструкцией. Задачи: 1- сопоставить характеристики (поведенческие, спектров ЭЭГ) здоровых испытуемых во время выполнения психомоторного теста [17] перед дневным сном и после спонтанного пробуждения; 2- сравнить уровень тревожности испытуемых с разной эффективностью выполнения психомоторного теста после пробуждения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытуемые

В исследовании участвовали 24 человека (16 женщин и 8 мужчин, возраст от 19 до 22 лет), без клинических нарушений сна или неврологических нарушений, правши, студенты московских вузов. Они были ознакомлены с процедурой исследования и дали согласие на участие в нем. Исследование соответствовало этиче-

ским нормам Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации "Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека" с поправками 2000 г. и "Правилами клинической практики в Российской Федерации", утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование одобрено этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Накануне обследования испытуемым предписывалось соблюдать привычный график сна и в день эксперимента воздерживаться от курения, употребления кофеина и алкоголя.

Процедура исследования

Начало эксперимента менялось в промежутке с 13.00 до 13.30. Непосредственно перед опытом испытуемые заполняли клинический опросник тревожности и депрессии (HADS). Для оценки параметров ночного сна, предшествующего обследованию, они также заполняли "Дневник сна" (время сна накануне, самочувствие при пробуждении и качество сна); для оценки дневной сонливости – опросник KSS (Каролинскую шкалу сонливости) и для характеристики текущего состояния опросник САН (самочувствие, активность, настроение). Испытуемые располагались на кушетке в лежачем положении, в полностью затемненном, звукоизолирующем помещении. После наложения электродов для записи ЭЭГ, окулограммы, миограмммы и механограммы испытуемого обучали без резких движений нажимать большим пальцем правой руки на кнопку, закрепленную на указательном пальце, и просили принять наиболее удобную для него позу для сна — под одеялом. При этом рука с кнопкой находилась поверх него. Свет выключался. Проводилась запись фоновой ЭЭГ с закрытыми глазами (5 мин). Далее в помещение входил экспериментатор и давал инструкцию, в случае необходимости инструкция повторялась. Потом он выходил и перед тем, как закрыть дверь, давал команду — после короткой паузы начать выполнение психомоторного теста. Для удобства испытуемого при отведении ЭЭГ использовался неопреновый шлем "MCScap 10-20" со съемными электродами "MCScap-T" для длительной регистрации биопотециалов и используемыми в полисомнографии (т.н. "тонкие" электроды). Качество записи контролировалось в режиме реального времени на экране монитора.

Продолжительность записи ЭЭГ варьировалась от 1 ч до 1 ч 20 мин. Этот промежуток включал в себя запись фоновой ЭЭГ (5 мин), прослушивание инструкции, выполнение психомоторного теста, приводящего к засыпанию, сон с самопроизвольными пробуждениями, которые сопровождались восстановлением выполнения теста и последующим засыпанием и окончательным пробуждением. В течение всей записи свет в помещении, где проводился опыт, отсутствовал. Для оценки продолжительности сна в целом и его второй стадии все полисомнограммы испытуемых были визуально стадированы согласно критериям Американской ассоциации медицины сна [18].

Использовали непрерывно-дискретный психомоторный тест [17]. Обследуемые считали "про себя" от 1 до 10, при этом синхронно при каждом отсчете они должны были нажимать на кнопку большим пальцем правой руки, зафиксированную на указательном пальце той же руки. Далее они продолжали считать "про себя" от 1 до 10, но уже без нажатий. Чередование счета с нажатиями и без нажатий продолжалось до тех пор, пока обследуемые не засыпали. При спонтанном пробуждении они должны были немедленно, без напоминания, не открывая глаз, возобновить выполнение психомоторного теста. В инструкции подчеркивалось, что при просыпании надо сначала выполнять счет с нажатием на кнопку и только потом без нажатия.

ЭЭГ с поверхности головы регистрировали от 17 электродов, расположенных в соответствии со схемой 10-20% (F_3 , F_4 , F_7 , F_8 , F_7 , F_8

 O_1 , O_2). Отведение ЭЭГ — монополярное, референтный электрод — объединенный ушной. Также регистрировали электроокулограмму (ЭОГ), необходимую для стадирования сна, миограмму (ЭМГ) для отслеживания движений большого пальца правой руки и механограмму нажатий на кнопку. Регистрацию проводили с помощью системы Neocortex-Pro (Neurobotics). Частота дискретизации — 250 Гц. Полоса пропускания частот: 0.5—70 Гц. ЭЭГ регистрировали с помощью шлема с хлорсеребряными электродами, с сопротивлением, не превышающим 5 кОм.

Отбор и анализ данных

Пробуждение 2-х испытуемых сопровождалось многочисленными двигательными артефактами, поэтому из последующего анализа их поведенческие и электрофизиологические данные были исключены. На основании наличия ошибок при выполнении психомоторного теста в период самопроизвольного пробуждения из второй стадии сна испытуемые были разделены на две группы: группа 1—10 человек (6 женщин и 4 мужчин) выполняла тест без ошибок; группа 2—12 человек (9 женщин и 3 мужчин) в процессе выполнения деятельности допускала ошибки: у этих испытуемых после пробуждения появлялись паттерны, в которых число нажатий было меньше требуемого инструкцией, следовательно, эффективность восстановления деятельности у них была ниже, чем у группы 1. Проводили сравнение между группами.

Анализировали поведенческие характеристики выполнения психомоторного теста и отводимую при этом ЭЭГ в двух экспериментальных ситуациях: 1- в самом начале опыта, 2- сразу после пробуждения. Время анализа в обоих случаях составляло 2 мин.

В качестве поведенческих характеристик использовали два показателя — число паттернов нажатий (1 паттерн — 10 нажатий в случае правильного выполнения теста и меньше 10-ти — при ошибочном) и число нажатий в целом за эпоху анализа.

Перед началом выполнения теста испытуемые выбирали наиболее удобное для себя положение руки и учились без резких движений нажимать на кнопку, что обусловило у всех участников эксперимента отсутствие артефактов в ЭЭГ в первые 2 мин выполнения теста (1-я экспериментальная ситуация) и в течение 2 мин сразу после пробуждения (2-я экспериментальная ситуация). Отметим, что в эти периоды, так же как и в течение всего опыта, глаза у испытуемых были закрыты. На основании быстрого преобразования Фурье для каждого отведения ЭЭГ на выделенных отрезках вычисляли спектральные функции (длина эпохи -4 с, для сглаживания использовали окно Хэмминга); далее их логарифмировали с целью приведения данных к нормальному распределению; затем проводили усреднение по всему анализируемому периоду деятельности и полученные характеристики ЭЭГ усредняли по частоте в дельта- (1-3 Гц), тета- (4-7.5 Гц), альфа1- (8-10.5 Гц) и альфа2- (11-13.5 Гц) диапазонах.

Поведенческие характеристики в целом по всей группе испытуемых анализировали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA RM). В качестве внутригруппового использовался фактор "ситуация" (2 уровня: в начале опыта и после пробуждения). Сравнение поведенческих и психометрических характеристик групп испытуемых без ошибок и с ошибками выполнения теста после пробуждения проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Полученные мощностные характеристики ЭЭГ для каждой из выделенных групп анализировали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA RM). В качестве внутригрупповых использовались следующие факторы: "ситуация" (2 уровня: в начале опыта и после пробуждения) и "отведение" (17 уровней: по числу отведений ЭЭГ). Анализ проводили отдельно для каждого из исследуемых частотных

диапазонов. Все результаты ANOVA RM получали с использованием поправки Гринхауса—Гейссера. Регионарные различия между ситуациями для каждого отведения оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Вычисления проводили с помощью пакетов программ Matlab 78.01 и SPSS 13.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все испытуемые правильно выполняли задания психомоторного теста в начале опыта. В период пробуждения у части испытуемых в том или ином числе паттернов с нажатиями наблюдалось уменьшение числа нажатий, что рассматривалось нами как выполнение заданий теста с ошибками. По всем испытуемым показано уменьшение числа паттернов нажатий и числа нажатий в целом при выполнении теста в период кратковременного пробуждения по отношению к периоду начала деятельности (F(1,20)=6.3, p=0.01 и F(1,20)=6.3, p=0.001 соответственно). При этом у субъектов, которые правильно воспроизводили задания теста это уменьшение незначимо (t=1.76, df=9, p=0.11 и t=1.76, df=9, p=0.11 соответственно). Они несколько медленнее выполняли тест после пробуждения и при этом всегда 10 раз нажимали на кнопку, когда это было необходимо. В группе с ошибками наблюдалось значимое уменьшение обоих поведенческих параметров (t=2.2, df=11, p<0.05 и t=3.72, df=11, p<0.01 соответственно).

Время сна ночью накануне исследования, его качество, самочувствие после пробуждения, а также уровень сонливости непосредственно перед опытом у групп субъектов без ошибок и с ошибками значимо не различались (t = -0.43, df = 20, p = 0.66, t = 0.70, df = 20, p = 0.49, t = -0.68, df = 20, p = 0.50 is t = -0.31, df = 20, p = 0.75 cootветственно). Среднее время сна в ночь перед опытом в группе без ошибок составляло 6.5 ± 0.3 ч (здесь и далее приводится среднее значение показателя и ошибка среднего: $M \pm SE$), в группе с ошибками -6.8 ± 0.6 ч; самочувствие при пробуждении -3.3 ± 0.3 и 3.0 ± 0.3 ; качество сна -3.6 ± 0.4 и 3.9 ± 0.2 соответственно (по 5-бальной шкале, при этом оценка 5 означает "отлично"); средний уровень сонливости перед опытом -5.1 ± 0.6 в безошибочной группе и 5.3 ± 0.5 в группе с ошибками (по 7-бальной шкале, при этом "отлично" — 1 балл: самый низкий уровень, т.е. высокую степень бодрствования). Общая продолжительность сна до исследуемого периода деятельности у групп без ошибок и с ошибками составила 13.1 ± 2.6 и 12.5 ± 2.9 мин соответственно, при этом длительность второй стадии -7.4 ± 1.8 и 8.5 ± 2.5 мин. Также не различались характеристики состояния испытуемых этих групп, оцениваемые по тесту САН (t = 1.48, df = 20, p = 0.15; t = 0.59, df = 20, p = 0.56и t = 1.95, df = 20, p = 0.07 соответственно). Самочувствие в группе без ошибок составляло 52.8 ± 3.3 балла, в группе с ошибками -46.2 ± 3.0 ; активность 48.8 ± 3.7 и 45.9 ± 3.2 баллов соответственно; настроение -55.3 ± 2.8 и 62.3 ± 2.2 балла соответственно. Согласно результатам тестирования по "госпитальной шкале тревожности и депрессии" у испытуемых, которые допускали ошибки при выполнении психомоторного теста в период кратковременного пробуждения, показатели уровней тревожности и депрессии были значимо больше (Z = -2.75, p < 0.01 и Z = -2.85, p < 0.01 соответственно) (рис. 1).

Статистическая оценка изменений в исследуемых ритмах ЭЭГ от ситуации в начале опыта к состоянию начала деятельности после сна по отведениям и группам с разной эффективностью приведены на рис. 2.

Результаты дисперсионного анализа приведены в табл. 1-2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выполнение психомоторного теста после самопроизвольного пробуждения во время дневного сна по поведенческим и нейрофизиологическим показателям от-

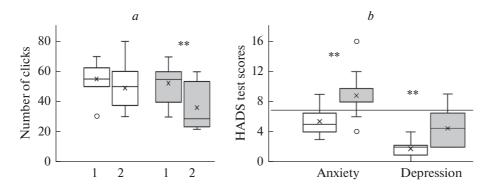


Рис. 1. Диаграммы "ящик с усами" поведенческих и индивидуальных характеристик испытуемых с разной эффективностью восстановления деятельности в период пробуждения из дневного сна. Белые фигуры — испытуемые с высокой эффективностью, серые — с низкой. (a) — число нажатий перед сном в начале опыта (1) и после пробуждения (2); (b) — уровни тревожности (Anxiety) и депрессии (Depression) (в баллах), прямая линия — уровень нормы; ** — p < 0.01.

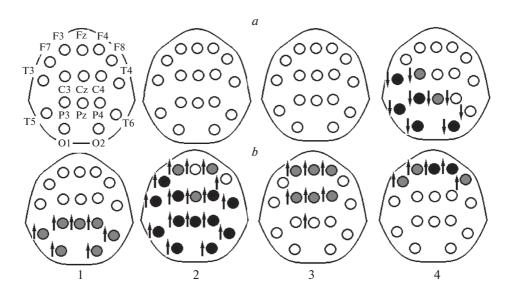


Рис. 2. Карты-схемы изменений мощностных характеристик ритмов ЭЭГ от ситуации деятельности перед дневным сном в начале опыта к ситуации восстановления этой деятельности в период кратковременного пробуждения у испытуемых с разной эффективностью восстановления. (a) — испытуемые с высокой эффективностью восстановления, (b) — с низкой; 1-4 — дельта-, тета-, альфа-1- и альфа-2-ритмы соответственно; значки "стрелка вверх" и "стрелка вниз" — увеличение и уменьшение мощности ритмов соответственно; серые и черные круги — значимость изменений: p < 0.05 и p < 0.01 соответственно. На карте-схеме в верхнем левом углу рисунка показаны названия отведений ЭЭГ.

личается от аналогичной деятельности в начале опыта перед засыпанием. У испытуемых снизилась скорость осуществления заданий теста, появились ошибки, у некоторых испытуемых существенно увеличились мощности тета-ритма в ЭЭГ. Рост этого ритма рассматривается как один из признаков инерции сна [6]. Деление субъектов на группы с ошибками и без ошибок выявило, что они различаются по

кой эффективноствю деятельности при кратковременном прооуидении во времы дневного спа				
Факторы	Диапазоны ЭЭГ			
	Дельта	Тета	Альфа-1	Альфа-2
"Ситуация"	F(1,9) = 1.71 p = 0.22	F(1,9) = 1.25 p = 0.29	F(1,9) = 0.001 p = 0.97	F(1,9) = 6.10 p = 0.036
"Ситуация"* "Отвеление"	F(3,25) = 1.14 n = 0.35	F(3,29) = 0.59 p = 0.64	F(3,26) = 2.68 p = 0.069	F(3,28) = 4.93 n < 0.001

Таблица 1. Результаты дисперсионного анализа (ANOVA RM) у группы испытуемых с высокой эффективностью деятельности при кратковременном пробуждении во время дневного сна

Знак "*" в колонке "факторы" — взаимодействие факторов дисперсионного анализа. В ячейках таблицы приведены степени свободы, значения критерия Фишера и уровни достоверности влияния соответствующих факторов и их взаимодействия на характеристики средних значений мощности указанных ритмов.

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа (ANOVA RM) у группы испытуемых с низкой эффективностью деятельности при кратковременном пробуждении во время дневного сна

Факторы	Диапазоны ЭЭГ			
	Дельта	Тета	Альфа-1	Альфа-2
"Ситуация"	F(1,11) = 3.13 p = 0.10	F(1,11) = 22.37 $p = 0.001$	F(1,11) = 3.42 p = 0.091	F(1,11) = 0.65 p = 0.44
"Ситуация"* "Отведение"	F(3,38) = 2.71 p = 0.05	F(3,33) = 2.74 p < 0.05	F(3,29) = 3.09 p < 0.05	F(4,40) = 11.27 $p < 0.001$

Обозначения, как в табл. 1.

индивидуальным и нейрофизиологическим характеристикам. Показатели тревожности и депрессии у группы с ошибками были больше. Уровень тревожности при этом у них был повышенным, а уровень депрессии хоть и был выше, чем в группе без ошибок, но находился в границах нормы. При этом по качеству сна, его продолжительности накануне исследования, уровню текущей сонливости, а также по показателям функциональной активности, согласно шкалам опросника САН, группы не различались. После пробуждения у испытуемых с ошибками отмечалось достоверное замедление выполнения заданий теста и увеличение мощности дельта- и тета-ритмов по сравнению с началом опыта. У испытуемых, которые не ошибались, эти изменения отсутствовали. Увеличение после сна низкочастотных спектральных характеристик ЭЭГ, в особенности дельта-ритма, является признаком инерции сна и может быть ответственным за отрицательные физические и когнитивные эффекты, наблюдаемые в этот период [2-5, 11]. Дельта-колебания ЭЭГ характеризуют внутреннюю бистабильность (чередование гиперполяризации и деполяризации нейронов) корковой сети, нарушают синхронное взаимодействие корковых областей мозга, необходимое для функционирования сознания [5]. Ранее нами была показана связь увеличения мощности дельта-ритма после пробуждения с реализацией деятельности на фоне сниженного уровня сознания [19]. Можно предположить, что после пробуждения его уровень у испытуемых с ошибками понизился по отношению к состоянию полной бдительности, характерной для деятельности в самом начале опыта.

У этих же испытуемых показан рост представленности низкочастотных и высокочастотных альфа-колебаний в передних областях отведения ЭЭГ. Увеличение мощности альфа-ритма во фронтальных областях коры наблюдается после пробуждения в состоянии покоя [20, 21] и при деятельности [6, 11, 19], и также рассматривается как признак инерции сна. Кратковременный сон у тревожных испы-

туемых может снижать свойственную им избыточную активацию коры [22], о чем свидетельствует увеличение мощности этого ритма после пробуждения. При этом более низкое качество ночного сна у тревожных пациентов [12, 13] и ошибки после пробуждения при выполнении теста практически здоровых, но с субклиническим уровнем тревожности испытуемых в нашем исследовании, дают основания поставить вопрос о качестве кратковременного дневного сна и его положительного эффекта на их функциональное состояние.

В группе без ошибок наблюдалось снижение мощности высокочастотных колебаний альфа-диапазона в каудальных областях коры и левой центральной и передне-височных зонах. Уменьшение мощностных характеристик альфа-ритма связывается с активационными процессами в мозге [23]. Можно предположить, что рост активации в процессе выполнения заданий после сна является компенсационным механизмом, который противодействует развитию инерции сна. При этом надо упомянуть, что связь уменьшения мощностных характеристик альфа-ритма с активационными процессами в мозге, согласно данным литературы, показана для состояния бодрствования при открытых глазах, т.е. в экспериментальных условиях, существенно отличающихся от наших. Тем самым полученные нами результаты оставляют простор для их истолкования читателями. Отсутствие изменений в дельта-, тета-и низкочастотном альфа-диапазонах, а также отсутствие значимого уменьшения скорости выполнения психомоторного теста позволяют утверждать, что признаки инерции сна в группе, выполняющих деятельность без ошибок, выражены существенно меньше.

Таким образом, непродолжительный дневной сон неодинаково влияет на эффективность восстановления деятельности здоровыми испытуемыми с разным уровнем тревожности. После пробуждения у субъектов с повышенной тревожностью в большей степени проявляется инерция сна, и они хуже выполняют задания психомоторного теста, чем в начале опыта. Влияние инерции сна на менее тревожных испытуемых незначительно.

Ранее мы поставили в соответствие степень восстановления психомоторной деятельности непосредственно после спонтанного пробуждения уровню восстановления сознания [19, 24]. Число нажатий на кнопку в попытке, успешной или нет, воспроизвести первый паттерн нажатий после пробуждения и соответствующие им изменения в ЭЭГ позволяют параметризовать и тем самым различать разные состояния сознания: от полной бдительности с первого паттерна нажатий до крайне сниженного уровня, не позволяющего осуществить этот паттерн деятельности до конца. За рамками этих исследований оставались случаи, когда испытуемые длительное время после пробуждения выполняли задания теста с ошибками. Мы полагаем, что уровень сознания этих испытуемых был ниже, чем у группы, которая безукоризненно выполняла задания теста после пробуждения. Наличие/отсутствие ошибок в данном случае мы рассматриваем как вклад в параметризацию, в оценку уровня сознания после пробуждения. С другой стороны, в исследовании, которому посвящена эта статья, мы обнаружили, что наличие/отсутствие ошибок в данных обстоятельствах связано с уровнем тревожности, и не исключаем связь этой индивидуальной характеристики субъектов со степенью восстановления сознания при пробуждении.

Многие исследования эффективности деятельности после сна, в особенности японских физиологов, психологов и социологов, ориентированы на поиски методов улучшения производительности труда в течение рабочего дня, например, в послеобеденное время. Мы полагаем, что и наше исследование имеет прикладную составляющую и не будет обойдено вниманием соответствующих специалистов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантом РФФИ (№ 20-013-00683а) и средствами государственного бюджета по государственному заданию Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021-2023 гг.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Руководство работой, методическая разработка (В.Б.Д.); идея работы, планирование эксперимента и сбор данных (Е.А.Ч., Н.Е.П.); обработка данных (Е.А.Ч.); написание и редактирование манускрипта (Е.А.Ч., Н.Е.П., В.Б.Д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Руцкова ЕМ* (2016) Инерция сна. Эффективная фармакотерапия. Неврология. Спецвыпуск "Сон и его расстройства 4" 19: 16—23. [Rutskova YeM Sleep Inertia. Effektivnaya farmakoterapiya. Spetsvypusk "Son i ego rasstroistva – 4" 19: 16–23. (În Russ)].
- 2. Trotti LM (2017) Waking up is the hardest thing I do all day: Sleep inertia and sleep drunkenness. Sleep Med Rev 35: 76-84. https://doi.org/10.1016/j.smrv.2016.08.005
- 3. Marzano C, Ferrara M, Moroni F, De Gennaro L (2011) Electroencephalographic sleep inertia of the awakening brain. Neuroscience 176: 308-317. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.014
- 4. Gorgoni M, Ferrara M, D'Atri A, Lauri G, Scarpelli S, Truglia I, De Gennaro L (2015) EEG topography during sleep inertia upon awakening after a period of increased homeostatic sleep pressure. Sleep Med 16(7): 883-890. https://doi.org/10.1016/j.sleep.2015.03.009
- 5. Chen X, Hsu C-F, Xu D, Yu J, Lei X (2020) Loss of frontal regulator of vigilance during sleep inertia: Asimultaneous EEG-fMRI study. Hum Brain Mapp 41(15): 4288–4298. https://doi.org/10.1002/hbm.25125
- 6. Tassi P, Bonnefond A, Engasser O, Hoeft A, Eschenlauer R, Muzet A (2006) EEG spectral power and cognitive performance during sleep inertia: the effect of normal sleep duration and partial sleep deprivation. Physiol Behav 87(1): 177–184. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.09.017
- 7. Hilditch CJ. Dorrian J. Banks S (2017) A review of short naps and sleep inertia: do naps of 30 min or less really avoid sleep inertia and slow-wave sleep? Sleep Med 32: 176–190. https://doi.org/10.1016/j.sleep.2016.12.016
- 8. Полуэктов МГ, Нарбут АМ, Дорохов ВБ (2020) Кратковременный дневной сон и консолидация памяти. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 120(8): 127-132. [Poluektov MG, Narbut AM, Dorohov VB (2020) Short-term daytime sleep and memory consolidation. Zhurn nevrol psihiatr im SS Korsakova 120(8): 127–132. (In Russ)]. https://doi.org/10.17116/jnevro2020120081127
- 9. Maas JB, Wherry ML, Axelrod DJ, Hogan BR, Bloomin J (1998) Power sleep: The revolutionary program that prepares your mind for peak performance. New York. Villard.
- 10. Hayashi M, Watanabe M, Hori T (1999) The effects of a 20 min nap in the mid-afternoon on mood, performance and EEG activity. Clin Neurophysiol 110(2): 272–279. https://doi.org/10.1016/s1388-2457(98)00003-0
- 11. Vallat R, Meunier D, Nicolas A, Ruby P (2019) Hard to wake up? The cerebral correlates of sleep inertia assessed using combined behavioral, EEG and fMRI measures. NeuroImage 184: 266–278. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.09.033
- 12. Horváth A, Montana X, Languart J-P, Hubain Ph, Szűcs A, Linkowski P, Loas G (2016) Effects of state and trait anxiety on sleep structure: A polysomnographic study in 1083 subjects. Psych Res 244: 279-283. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.03.001
- 13. Полуэктов МГ, Пчелина ПВ (2017) Расстройства сна и тревога. Эффективная фармакотерапия. Неврология и психиатрия. Спецвыпуск "Сон и его расстройства – 5" 35: 80-

- 89. [*Poluektov MG, Pchelina PV* (2017) Sleep Disorders and Anxiety. Effektivnaya farmakoterapiya. Spetsvypusk "Son i ego rasstroistva 5" 35: 80–89. (In Russ)].
- Stephan Y, Sutin AR, Bayard S, Križan Z, Terracciano A (2018) Personality and sleep quality: Evidence from four prospective studies. Health Psychol 37: 271–281. https://doi.org/10.1037/hea0000577
- 15. Sutin AR, Gamaldo AA, Stephan Y, Strickhouser J E, Terracciano A (2019). Personality Traits and the Subjective and Objective Experience of Sleep. Int J Behav Med 27: 481–485. https://doi.org/10.1007/s12529-019-09828-w
- 16. Sella E, Carbone E, Toffalini E, Borella E (2020). Personality traits and sleep quality: The role of sleep-related beliefs. Person and Individ Differences 156: 109770. https://doi.org/10.1016/j.paid.2019.109770
- 17. Дорохов ВБ (2003) Альфа-веретена и К-комплекс фазические активационные паттерны при спонтанном восстановлении нарушений психомоторной деятельности на разных стадиях дремоты. Журн высш нерв деят 53(4): 502—511. [Dorokhov VB Alpha-spindle and K-complex phase activation patterns during spontaneous recovery of psychomotor activity disorders at different stages of nap. Zhurn Vyssh Nerv Deyat 53(4): 502—511. (In Russ).]
- 18. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Lloyd RM, Marcus CL, Vaughn BV (2015) The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, Version 2.2. www.aasmnet.org. Darien, Illinois: Am Acad Sleep Med.
- 19. Cheremushkin EA, Petrenko NE, Gendzhalieva MS, Malakhov DG, Dorokhov VB (2020) EEG Characteristics during Short-Term Spontaneous Waking Periods of Different Durations with Changes in Psychomotor Activity Induced by Falling Asleep. J Neurosci Behav Physiol 50(9): 1232–1238. https://doi.org/10.1007/s11055-020-01024-8
- Radzi SSM, Asirvadam VS, Hutapea DKY, Dass SC (2018) Comparison of EEG signals during alert and sleep inertia states using fractal dimension. 2018 IEEE 14th International Colloquium on Signal Processing & Its Applications (CSPA) https://doi.org/10.1109/cspa.2018.8368704
- Britton JW, Frey LC, Hopp JL, Korb P, Koubeissi MZ, Lievens WE, Pestana-Knight EM, Louis EKSt (2016). Electroencephalography (EEG): An Introductory Text and Atlas of Normal and Abnormal Findings in Adults, Children, and Infants. Allen Press Inc: Lawrence KS USA. https://doi.org/10.5698/978-0-9979756-0-4
- 22. Siciliani O, Schiavon M, Tansella M (1975) Anxiety and EEG alpha activity in neurotic patients. Baseline Correlations and Changes During a Double-Blind Trial with Temazepam. Acta Psych Scand 52(2): 116–131. https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1975.tb00028.x
- 23. *Klimesch W* (1999) EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. Brain Res Rev 29(2–3): 169–195. https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00056-3
- 24. *Черемушкин ЕА, Петренко НЕ, Дорохов ВБ* (2021) Сон и нейрофизиологические корреляты активации сознания при пробуждении. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 121(4–2): 14–18. https://doi.org/10.17116/jnevro202112104214

EEG Characteristics and the Level of Anxiety of Tests with Different Successes of Restoring Psychomotor Activities during Waking Up during Daily Sleep

E. A. Cheremushkin^{a, *}, N. E. Petrenko^a, and V. B. Dorokhov^a

^a Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia *e-mail: khton@mail.ru

In healthy adults with different levels of anxiety, the effectiveness of restoring monotonous activity after a short episode of daytime sleep was studied. A continuous-discrete psychomotor test was used, during which the participants of the experiment performed two successively alternating tasks: counting "to oneself" from 1 to 10, accompanied by synchronous pressing of the button with the right hand, and only counting "to oneself", without pressing. During the entire experiment, the subjects' eyes were closed. Before falling asleep, everyone performed the test tasks correctly. Those of them who, after waking up, began to make mistakes in the number of clicks and perform the test significantly slower, an increase in the spectral power of delta, theta and alpha oscillations in

the EEG was shown. This result indicates pronounced signs of sleep inertia in the conditions of which the activity was carried out. In the group of subjects who accurately reproduced the test tasks in both experimental situations, no changes were detected in the delta -, theta - and alpha-1 spectral ranges of the EEG after awakening compared to the period of the beginning of the experiment. This fact, as well as the fact that the speed of test execution decreased insignificantly, suggests that the consequences of short-term sleep influenced their performance of the psychomotor test to a lesser extent. The decrease in the power of alpha-2 oscillations in the caudal areas of the EEG derivation, we believe, reflects the activation processes that provide more effective activity in these conditions. A short nap of the day has a different effect on the efficiency of recovery of the activity of healthy subjects with different levels of anxiety. After waking, subjects with increased anxiety show signs of sleep inertia to a greater extent, and they perform worse on the tasks of the psychomotor test than at the beginning of the experiment, before falling asleep. The influence of short-term sleep on the effectiveness of the test in less anxious subjects was significantly less pronounced.

Keywords: daytime sleep, awakening, sleep inertia, recovery of activity, anxiety, EEG

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ ФУНКЦИИ САМЦОВ КРЫС

© 2021 г. С. Г. Пивина¹, В. В. Ракицкая¹, В. К. Акулова¹, Г. И. Холова¹, Е. Д. Шигалугова¹, Н. Э. Ордян^{1, *}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: neo@infran.ru

> Поступила в редакцию 15.07.2021 г. После доработки 26.07.2021 г. Принята к публикации 26.07.2021 г.

Глюкокортикоидные гормоны угнетают продукцию тестостерона клетками Лейдига, взаимодействуя с глюкокортикоидными рецепторами, локализованными в этих стероид-продуцирующих клетках. У взрослых пренатально стрессированных самцов наряду с повышенным уровнем кортикостерона в крови наблюдается и повышение уровня тестостерона, что может быть обусловлено снижением количества глюкокортикоидных рецепторов в клетках Лейдига. На проверку этой гипотезы направлено данное исследование. Уровень глюкокортикоидных рецепторов в клетках Лейдига определяли с использованием количественной иммуногистохимии. Кроме того, мы исследовали показатели сперматогенеза и качества спермы, а также репродуктивный потенциал, который анализировали по способности самцов оплодотворять самку и производить потомство. Исследования показали снижение числа сперматогенных клеток в спрематогенном эпителии семенных канальцев пренатально стрессированных самцов, несмотря на повышенный уровень тестостерона в крови. Морфометрические показатели семенных канальцев, такие как толщина и площадь сперматогенного эпителия у пренатально стрессированных самцов были увеличены, так же, как и количество клеток Сертоли и их площадь. Мы обнаружили статистически значимое увеличение числа аномальных и неподвижных сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса пренатально стрессированных самцов. Количество клеток Лейдига в интерстициальной ткани семенников у этих самцов было снижено, но площадь их увеличена по сравнению с контрольными самцами. Уровень глюкокортикоидных рецепторов в клетках Лейдига пренатально стрессированных самцов был снижен. Тем не менее, выявленные изменения не повлияли на способность пренатально стрессированных самцов к оплодотворению самок и производству потомства. Сделано заключение, что увеличенный уровень тестостерона в крови пренатально стрессированных самцов на фоне повышения уровня глюкокортикоидных гормонов обусловлен снижением чувствительности клеток Лейдига к глюкокортикоидам.

Ключевые слова: пренатальный стресс, семенник, сперматогенез, клетки Лейдига, глюкокортикоидные рецепторы, крыса

DOI: 10.31857/S0869813921100095

В литературе имеются указания на изменение полового поведения взрослых самцов крыс, рожденных от матерей, которые подвергались стрессированию во

время беременности. Эти изменения заключались в склонности к демонстрированию лордоза, который характерен для самок [1]. Следует отметить, что такой паттерн полового поведения пренатально стрессированных самцов был характерен для потомков матерей, которых стрессировали в последнюю треть гестации. Этиология атипичного полового поведения таких пренатально стрессированных самцов определяется снижением пика тестостерона, который в норме наблюдается на 18—19-й пренатальный день жизни, а также в течение первых часов после рождения [2, 3]. Отсутствие выброса тестостерона в эти "критические" дни пре- и постнатальной жизни снижает аногенитальное расстояние у новорожденных самцов, а также нарушает половую дифференцировку ряда структур мозга за счет снижения активности фермента ароматазы 450 [4, 5].

Интересно, что несмотря на снижение уровня тестостерона в "критические" периоды перинатального онтогенеза, у взрослых пренатально стрессированных самцов уровень тестостерона в крови оказывается повышенным, хотя такие животные демонстрируют уменьшение числа эякуляций и снижение чувствительности к тестостерону [6]. Повышенный уровень тестостерона у взрослых самцов крыс наблюдается и в случае введения беременным матерям с 14-го по 19-й день гестации синтетического глюкокортикоида дексаметазона [7]. При этом такие самцы имеют повышенный базальный уровень кортикостерона.

Как известно, глюкокортикоидные гормоны угнетают продукцию тестостерона клетками Лейдига, взаимодействуя с глюкокортикоидными рецепторами (ГР), локализованными в этих стероид-продуцирующих клетках, за счет снижения экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза тестостерона [8]. Усиление продукции тестостерона клетками Лейдига на фоне повышенного уровня кортикостерона у самцов с пренатальным стрессом может быть опосредовано снижением количества ГР в клетках Лейдига, однако этот вопрос изучен не был.

Помимо клеток Лейдига, ГР у взрослых крыс и мышей экспрессируются и в других клетках семенников, а именно в макрофагах, фибробластах, гладкомышечных клетках и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, а также в ряде сперматогенных клеток [9, 10]. В клетках Сертоли ГР обнаружены только у неполовозрелых животных [11].

Несмотря на то, что проблема влияния пренатального стресса на половые функции самцов имеет давнюю историю, начинающуюся с публикации Ward в 1972 г. [12], состояние репродуктивных органов, в частности семенников, а также показатели сперматогенеза взрослых пренатально стрессированных самцов изучены недостаточно. В связи с этим в данном исследовании был изучен гормональных профиль взрослых самцов крыс, рожденных от матерей, подвергавшихся иммобилизационному стрессу с 14-го по 19-й день гестации, состояние семенников, показатели сперматогенеза и качества спермы (число аномальных сперматозоидов), а также репродуктивный потенциал, который анализировали по способности этих самцов оплодотворить самку и произвести потомство. Кроме того, в клетках Лейдига была изучена экспрессия ГР иммуногистохимическим методом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 10 половозрелых самках крыс линии Вистар массой 210—230 г из ЦКП "Биоколлекция" Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, а также на их потомках - самцах массой 230—240 г в возрасте 3 мес. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и корму (гранулированный комбикорм) и со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 ч. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Ба-

зельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Беременных самок разделяли на две группы, одну из которых (n=5) с 14-го по 19-й день беременности подвергали ежедневному иммобилизационному стрессу в течение 1 ч (ограничение подвижности в узких пластиковых пеналах) в условиях повышенной освещенности 400 лк. Вторую группу самок (n=5) оставляли интактными. Самок содержали в группах до 19-го дня беременности, а далее по одной особи в клетке. На 2-й день после родов пометы выравнивали до 8 крысят с равным соотношением полов. Крысят содержали с матерями до 30-го дня жизни, а далее по 6 особей в клетке.

Дальнейшие эксперименты выполняли на половозрелых самцах — потомках стрессированных или интактных матерей. С целью нивелирования влияния матери на потомство в эксперимент брали по 2 самца из каждого помета. Самцов предварительно взвешивали, на следующий день декапитировали, извлекали семенники, надпочечники и эпидидимусы. Туловищную кровь собирали, затем пробы крови центрифугировали ($1000\ g,\ 20\ мин,\ 4^{\circ}$ C) и далее плазму хранили при температуре -20° C до момента определения содержания в ней гормонов.

Правый семенник от каждого самца фиксировали в жидкости Буэна течение 24 ч при комнатной температуре. Далее осуществляли стандартную гистологическую обработку ткани семенников путем проводки через этиловые спирты возрастающей концентрации (70, 80, 96% по 1 ч) и бутанолы (1ч и ночь). Затем материал проводили через 4 порции ксилола по 15 мин и заливали в парафиновые блоки. При помощи микротома изготавливали серии чередующихся срезов семенных желез во фронтальной плоскости толщиной 5-7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилиномэозином. Морфометрические исследования проводили с использованием светового микроскопа Olimpus (Япония), цифровой камеры vz-c50s (Videozavr, Россия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением "Videotest Master Morphology" (Россия) при общем увеличении $10 \times 10, 40 \times 10, 100 \times 10$. Морфологические особенности строения семенных желез исследовали по следующим параметрам: площадь поперечного сечения извитого семенного канальца; толщина сперматогенного эпителия извитого семенного канальца; количество клеток Сертоли в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца и их площадь; количество разных видов сперматогенных клеток (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды) в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца, количество сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца, а также число и площадь клеток Лейдига в интерстициальной ткани. Измерения проводили в 20 поперечных срезах извитых семенных канальцев и окружающих их участках интерстициальной ткани, полученных от каждого самца. На основании количественных данных, полученных при цитологическом исследовании семенников, рассчитывали ряд показателей, характеризующих сперматогенез: 1) общий показатель сперматогенеза — отношение количества сперматид к количеству сперматогоний; 2) клеточный индекс Сертоли отношение суммы всех сперматогенных клеток (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды) к сумме клеток Сертоли в одном извитом канальце, величина которого положительно коррелирует со спермопродукцией [13, 14].

Эпидидимисы после извлечения немедленно помещали в сосуд с 1 мл питательной среды G-MOPS PLUS (Virtolife, Швеция) нагретый до 37°С. На эпидидимисы наносили продольный разрез и инкубировали в течение 10 мин при температуре 37°С, позволяя сперматозоидам свободно всплыть. Взвесь сперматозоидов разводили 1:10, наносили на предметное стекло и окрашивали 5%-ным раствором эозина. Шлифованным стеклом делали мазок, который высушивали и исследовали под световым микроскопом. К дегенеративным (патологическим) формам относили сперматозоиды с двумя головками, но с одной шейкой и одним хвостом, без шейки

с одним или несколькими хвостами, сперматозоиды с неправильной формой головки. Подсчитывали не менее 400 сперматозоидов от каждого животного. Результаты представлены в виде % аномальных спермиев от общего числа подсчитанных сперматозоидов.

Подвижность сперматозоидов оценивали следующим образом: каплю разведенной 1:10 суспензии сперматозоидов, полученных из эпидидимиса, наносили на предметное стекло, помещали под объектив светового микроскопа с цифровой камерой и производили видеосъемку движения сперматозоидов в течение 10 мин. Сперматозоиды разделяли на 4 класса: 1 — неподвижные, 2 — дергающиеся, 3 — слабо двигающиеся и 4 — совершающие прогрессивные движения.

Левый семенник помещали в 4%-ный раствор параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) на 24 ч, затем разрезали на 4 части и дополнительно держали 48 ч в растворе параформальдегида при 4°С. Далее материал после стандартной обработки (промывка, обезвоживание, проведение через порции ксилола) заливали в парафин. Изготавливали серии срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 6 мкм. С помощью метода немеченых антител (авидин-биотинового) и иммунопероксидазной реакции проводили выявление иммунореактивного вещества. После стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена (кипячение срезов в 0.01 М цитратном буфере (рН 6.0) под давлением в течение 1 мин), срезы в течение ночи при 4°С инкубировали с первичными поликлональными антителами к ГР (Abcam, ab3578) в разведении 1:150. Далее на срезы наносили универсальную систему авидин-биотинового комплекса (rabbit specific HRP/DAB (ABC) detection IHP Kit, Abcam, ab64261) и оставляли инкубироваться 30 мин при комнатной температуре. После инкубации с АВС-комплексом стекла промывали в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Далее визуализировали реакцию связывания антитела с антигеном диаминобензидином, входящим в состав кита. Количественную оценку иммунореактивности производили с использованием той же системы анализа изображения, что и в случае морфометрического анализа семенников. Оценивали среднюю оптическую плотность окраски в иммунопозитивных клетках Лейдига. Подсчет производился на 4 срезах от каждого животного, анализировали иммуногистохимическое окрашивание не менее 50 клеток Лейдига на каждом срезе. На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 3 класса: слабо- (0.05-0.1 ед. оптической плотности, 3-й класс), средне- (0.1-0.25 ед. оптической плотности, 2-й класс) и сильноиммунозитивные (0.25-0.5 ед. оптической плотности, 1-й класс) клетки.

Для оценки общей иммунореактивности (ОИр) использовали формулу:

$$1 \times n(3 \text{ кл.}) + 2 \times n(2 \text{ кл.}) + 3 \times n(1 \text{ кл.}) = \text{ОИр},$$

где n — число клеток 1-го, 2-го и 3-го класса соответственно [15].

Каждая группа пренатально стрессированных и контрольных самцов, подвергнутых декапитации, состояла из 5 животных.

В отдельной серии экспериментов оценивали репродуктивный потенциал самцов двух экспериментальных групп. С этой целью каждого самца подсаживали к двум рецептивным самкам, находящимся в стадии проэструс/эструс. На следующий день у самок брали вагинальный мазок для выявления в нем сперматозоидов. Если сперматозоиды обнаружены не были, то самцов оставляли с самками еще на один эстральный цикл с ежедневным забором вагинальных мазков. Фиксировали латентный период появления сперматозоидов в вагинальном мазке. Далее оплодотворенных самок оставляли в группах до 19-го дня беременности, а далее по одной особи в клетке. После родов на 2-й день производили подсчет числа самцов и самок в пометах. В данной серии экспериментов каждая группа самцов состояла из 5 животных.

Показатель	Контрольные самцы $(n = 5)$	Пренатально стрессированные самцы $(n = 5)$
Масса животных, г	297.5 ± 5.9	334 ± 11.1*
Масса надпочечников, г	67.2 ± 3.7	64.2 ± 0.6
Масса семенников, г	3.2 ± 0.04	$3.4 \pm 0.07*$
Весовой индекс семенников, %	1.08 ± 0.02	$1.01 \pm 0.03*$
Содержание кортикостерона в плазме крови, нмоль/л	161 ± 22.6	251 ± 28.7*
Содержание тестостерона в плазме крови, нмоль/л	10.0 ± 1.9	18.5 ± 2.5*

Таблица 1. Показатели состояния пренатально стрессированных самцов крыс

Определение уровня гормонов в плазме крови проводили методом иммуноферментного анализа, используя стандартные наборы производства XEMA (Россия) для кортикостерона и тестостерона. Оценку реакции проводили на анализаторе Multickan FS (ThermoFisherScientific, Финляндия). Перед началом определения плазму размораживали. Дальнейшее определение уровней гормонов в плазме крови проводили согласно инструкции производителя.

Статистический анализ полученных данных проводи с использованием однофакторного ANOVA с последующим парными *post-hoc* (тест Тьюкки) сравнением отдельных групп. Расчеты осуществляли в пакете программ STATISTICA 12.0. В качестве критерия достоверности принимали p < 0.05. Результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что пренатально стрессированные самцы существенно отличаются от контрольных крыс по большинству исследованных параметров. Выявлено увеличение массы тела и семенников у пренатально стрессированные животных, однако весовой индекс (отношение массы семенников к массе тела × 100%) у них был статистически значимо снижен по сравнению с контрольными самцами (табл. 1). При этом уровень тестостерона и кортикостерона у пренатально стрессированные самцов был повышен.

Морфометрический анализ извитых семенных канальцев показал, что у пренатально стрессированных самцов увеличена площадь поперечного сечения и площадь сперматогенного эпителия извитого семенного канальца (табл. 2). Количество клеток Сертоли и их площадь также были увеличены у пренатально стрессированных самцов. При этом количество клеток Лейдига в интерстициальной ткани снижено, а их площадь увеличена по сравнению с контрольными животными. Обнаружено нарушение сперматогенеза вследствие пренатального стресса, о чем свидетельствовало снижение числа сперматоцитов и сперматид в сперматогенном эпителии, а также числа сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца. Выявлено также снижение клеточного индекса Сертоли у пренатально стрессированных самцов. Тем не менее, общий показатель сперматогенеза у опытных и контрольных самцов не различался. Обнаружено также увеличение числа аномальных спермиев, выделенных из эпидидимиса пренатально стрессированных самцов. Кроме того, у этих самцов отмечено увеличение числа неподвижных

^{*-}p < 0.05 статистически значимые различия между показателями контрольных и пренатально стрессированных самцов.

Таблица 2. Морфометрические показатели извитых семенных канальцев (ИСК), показатели
сперматогенеза и качества сперматозоидов

сперматогенеза и качества сперматозоидо	ЭВ	
Показатель	Контрольные самцы $(n = 5)$	Пренатально стрессированные самцы $(n=5)$
Площадь поперечного сечения ИСК, мкм ²	67815 ± 3210	74864 ± 2774*
Площадь сперматогенного эпителия ИСК, мкм ²	46494 ± 2838	$53838 \pm 2022*$
Толщина сперматогенного эпителия ИСК, мкм	39.2 ± 2.4	44.2 ± 1.9
Количество клеток Сертоли в сперматогенном эпителии	33.8 ± 1.4	$45.9 \pm 1.6***$
Площадь клеток Сертоли, мкм ²	98 ± 5.9	$112 \pm 4.5*$
Количество сперматогониев в сперматогенном эпителии	58 ± 4.9	49.4 ± 4.3
Количество сперматоцитов в сперматогенном эпителии	49.8 ± 0.9	46.5 ± 0.9 *
Количество сперматид в сперматогенном эпителии	141.5 ± 2.7	$111 \pm 6.3*$
Количество сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца	329 ± 22.9	264 ± 2*
Количество клеток Лейдига в интерстициальной ткани	126 ± 5.0	111 ± 5.9*
Площадь клеток Лейдига, мкм ²	36.8 ± 1.5	$42.4 \pm 1.4*$
Общий показатель сперматогенеза	2.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2
Клеточный индекс Сертоли	7.7 ± 0.3	$4.9 \pm 0.2***$
Число аномальных спермиев, выделенных из эпидидимиса, %	1.9 ± 0.3	$3.9 \pm 0.3**$
Латентный период оплодотворения самок, сут	1.9 ± 0.3	3 ± 0.7

^{*-}p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001, статистически значимые различия между показателями контрольных и пренатально стрессированных самцов.

сперматозоидов, хотя число подвижных сперматозоидов между пренатально стрессированными и контрольными самцами не различалось (рис. 1). Различий в латентном периоде оплодотворения самок (табл. 2), а также в числе крысят в пометах (рис. 2) между контрольными и пренатально стрессированными самцами обнаружено не было.

Анализ иммунореактивного вещества в клетках Лейдига показал снижение общей иммунореактивности к ΓP клеток у пренатально стрессированных самцов (рис. 3). Следует отметить, что иммунопозитивные к ΓP клетки были обнаружены и в сперматогенном эпителии семенного канальца (рис. 4). В связи с тем, что определение типа сперматогенных клеток был затруднен, в данном случае уровень экспрессии ΓP не определяли.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали значительное изменение сперматогенеза у пренатально стрессированных самцов, несмотря на повышенный уровень тестостерона. Морфометрические показатели семенных канальцев, такие как площадь

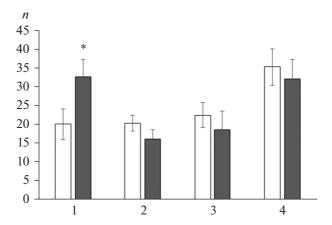


Рис. 1. Показатели подвижности сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса пренатально стрессированных и контрольных самцов. Пустые столбики — контрольные крысы; темные столбики — пренатально стрессированные крысы. 1 — число неподвижных сперматозоидов, 2 — число дергающихся сперматозоидов, 3 — число слабо двигающихся сперматозоидов, 4 — число сперматозоидов, совершающих прогрессивные движения. * Достоверные отличия от контрольных крыс (p < 0.05).

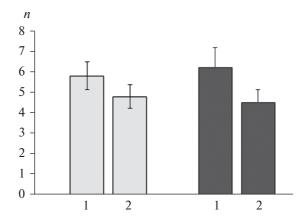


Рис. 2. Число самцов и самок в пометах, рожденных от пренатально стрессированных и контрольных самцов. Пустые столбики — потомки контрольных самцов; темные столбики — потомки пренатально стрессированных крыс. 1 — самки, 2 — самцы.

поперечного сечения, толщина и площадь сперматогенного эпителия у пренатально стрессированных самцов были увеличены так же, как и количество клеток Сертоли и их площадь. При этом у этих крыс мы обнаружили статистически значимое снижение количества сперматогенных клеток и сперматозоидов в семенных канальцах, увеличение числа аномальных и неподвижных сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса. В соответствии с этим клеточный индекс Сертоли, как показатель продуктивности сперматогенеза, был снижен.

Следует отметить, что количество клеток Лейдига в интерстициальной ткани семенников у пренатально стрессированных самцов было снижено, но площадь их

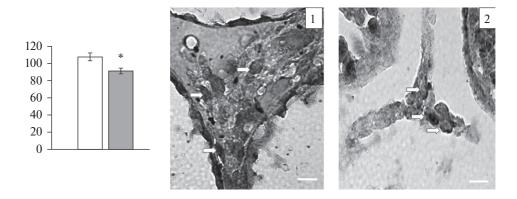


Рис. 3. Общая иммунореактивность к глюкокортикоидным рецепторам в клетках Лейдига пренатально стрессированных и контрольных животных.

Пустые столбики — контрольные крысы; темные столбики — пренатально стрессированные крысы. * — Достоверные отличия от контрольных крыс (p < 0.01). 1 — контрольные самцы, 2 — пренатально стрессированные самцы. Стрелками обозначены клетки Лейдига. Масштаб — 20 мкм.

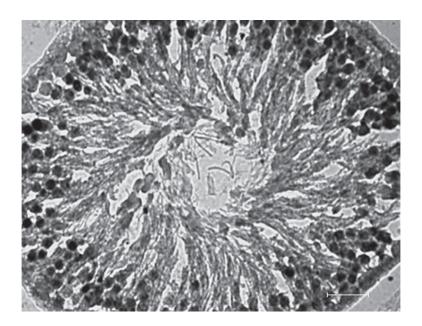


Рис. 4. Образец локализации глюкокортикоидных рецепторов в сперматогенных клетках семенного канальца, выявленной иммуногистохимическим методом. Масштаб -30 мкм.

увеличена по сравнению с контрольными самцами. Экспрессия ГР в этих клетках пренатально стрессированных самцов также была снижена.

Хорошо известно, что стрессорные воздействия, приводящие к повышению уровня глюкокортикоидов, влияют на продукцию тестостерона клетками Лейдига [8, 16]. Глюкокортикоидные гормоны, взаимодействуя с классическими рецепторами, напрямую ингибируют транскрипцию генов, кодирующие ферменты био-

синтеза тестостерона, такие как цитохром P450-зависимый фермент расщепления боковой цепи холестерина и цитохром P450-зависимая 17α-гидроксилаза/17,20-лиаза [17]. Ген регуляторного белка стероидогенеза (StAR) также подавляется глюкокортикоидами [18]. Кроме того, было показано, что снижение продукции тестостерона в условиях повышенного уровня глюкокортикоидов может быть опосредовано индукцией апоптоза в клетках Лейдига и соответственно уменьшением их
количества [19, 20]. Помимо этого, глюкокортикоиды могут оказывать быстрое,
негеномное действие на клетки Лейдига. Так, было показано, что введение кортикостерона мышам снижает продукцию тестостерона клетками Лейдига в течение
30 мин [21].

Помимо клеток Лейдига, ГР экспрессируются в сперматогониях. Было показано, что введение дексаметазона крысам индуцирует апоптоз в этих сперматогенных клетках. Совместное введение дексаметазона и антагониста ГР мефипристона устраняет проапоптотический эффект дексаметазона, что свидетельствует о вовлечении ГР в действие экзогенного глюкокортикоида [22]. Кроме того, было показано, что в условиях хронического стресса наблюдается ингибирование клеточного цикла в сперматогониях на G0/G1 фазе, что приводило к снижению числа сперматид в сперматогенном эпителии и сперматозоидов в эпидидимисе [16]. Интересно, что стресс в данном исследовании приводил к активации ГР, а введение антагониста ГР нормализовало число сперматозоидов у стрессированных крыс. Несмотря на то, что мы не выявили статистически значимого изменения числа сперматогониев в сперматогенном эпителии семенников пренатально стрессированных крыс, вероятно, снижение числа других сперматогенных клеток может быть обусловлено действием повышенного уровня кортикостерона на сперматогонии.

Следует отметить, что определенные нарушения сперматогенеза у пренатально стрессированных самцов не влияли на общий показатель сперматогенеза, оцениваемый по соотношению сперматогониев к сперматоцитам, что может быть обусловлено увеличением числа клеток Сертоли, поддерживающих процесс сперматогенеза [23]. Более того, увеличение числа аномальных и неподвижных сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса пренатально стрессированных самцов, существенным образом не сказывалось на их оплодотворяющей способности. Хотя латентный период оплодотворения самок у пренатально стрессированных самцов был несколько увеличен, в конечном итоге эти самцы оплодотворили всех самок. Количество крысят в пометах контрольных и пренатально стрессированных самцов также не различалось. Вероятнее всего, это определяется тем, что сперматозоиды продуцируются с избытком, а наличие в сперме пренатально стрессированных самцов нормальных подвижных сперматозоидов оказывается достаточным для реализации их репродуктивных функций. Мы также предполагаем, что повышение уровня тестостерона у пренатально стрессированных самцов является компенсаторным, что позволяет поддерживать активность клеток Сертоли для обеспечения сперматогенеза. Тем не менее, повышенный уровень глюкокортикоидных гормонов в сочетании с увеличенной стрессорной реактивностью пренатально стрессированных самцов может иметь более негативные последствия на их репродуктивные способности в неблагоприятных условиях (стрессорные воздействия) по сравнению с интактными самцами, что будет исследовано в дальнейших экспериментах.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН на 2020 г., тема № 0134-2019-0002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование работы (Н.Э.О.), подготовка и манипуляции с животными (Е.Д.Ш.), гистология и иммуногистохимия семенников (С.Г.П., В.В.Р.), сбор и анализ данных (Г.И.Х., В.К.А.), написание и редактирование манускрипта (С.Г.П., Н.Э.О.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Ward IL, Ward OB, Winn RJ, Bielawski (1994) Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors. Behav Neurosci 108: 1188–1195. https://doi.org/10.1037//0735-7044.108.6.1188
- 2. *Ordyan N.*, *Pivina SG* (2005) Effects of prenatal stress on the activity of an enzyme involved in neurosteroid synthesis during the "critical period" of sexual differentiation of the brain in male rats. Neurosci Behav Physiol. 35: 931–935.
- 3. Ward IL, Ward OB, Affuso JD, Long III WD, French JA, Hendrick SE (2003) Fetal testosterone surge: specific modulations induced in male rats by maternal stress and/or alcohol consumption. Horm Behav 43: 531–539. https://doi.org/10.1016/s0018-506x(03)00061-8
- 4. Weisz J, Brown BL, Ward IL (1982) Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of male and female rat fetuses. Neuroendocrinology 35: 374–379. https://doi.org/10.1159/000123410
- 5. Tobet S, Knoll JG, Hartshorn C, Aurand E, Stratton M, Kumar P, Searcy B, McClellan K (2009) Brain sex differences and hormone influences: a moving experience? J Nuroendocrinol 21: 387–392. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01834.x
- 6. Ward IL, Bennett AL, Ward OB, Shelton E, Hendricks SE, French JA (1999) Androgen threshold to activate copulation differs in male rats prenatally exposed to alcohol, stress, or both factors. Hormon Behav 36: 129–140. https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1534
- 7. Page KC, Sottas CM, Hardy MP (2001) Prenatal exposure to dexamethasone alters Leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats. J Andrology 22: 973–980. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03438.x
- 8. Hu G.-X, Lian Q.-Q, Lin H, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP, Gea R-S (2008) Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. Steroids. 73: 1018–1024. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.12.020
- 9. Whirledge S, Cidlowski JA (2017) Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. Trends Endocrinol Metab 28: 399–415. https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.02.005
- Smith LB, Walker WH (2014) The regulation of spermatogenesis by androgens. Semin Cell Dev Biol 30: 2–13. https://doi.org/10.1016/0018-506x(92)90005-g
- 11. Hazra R, Upton D, Jimenez M, Desai R, Handelsman DJ, Allan CM (2014) In vivo actions of the Sertoli cell glucocorticoid receptor. Endocrinology 155: 1120–1130. https://doi.org/10.1210/en.2013-1940
- 12. Ward IL (1972) Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. Science 175: 82–84. https://doi.org/10.1126/science.175.4017.82
- 13. Griswold MD (2018) 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. Biol Reprod 99: 87–100. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy027
- 14. Michaelis M, Sobczak A, Ludwig C, Marvanová H, Langhammer M, Schön J, Weitze J (2020) Altered testicular cell type composition in males of two outbred mouse lines selected for high fertility. Andrology 8: 1419–1427. https://doi.org/10.1111/andr.12802
- 15. Boos A, Kohtes J, Janssen V, Mülling C, Stelljes A, Zerbe H, Hässig M, Thole HH (2006) Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. Anim Reprod Sci 91: 55–76. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.03.012

- 16. Zou P, Wang X, Yang W, Liu C, Chen Q, Yang H, Zhou N, Zeng Y, Chen H, Zhang G, Liu J, Cao J, Ao L, Sun L (2019) Mechanisms of stress-induced spermatogenesis impairment in male rats following unpredictable chronic mild stress (uCMS). Int J Mol Sci 20: 4470. https://doi.org/10.3390/ijms20184470
- 17. Wang Y, Chen F, Ye L, Zirkin B, Chen H (2017) Steroidogenesis in Leydig Cells: Effects of Aging and Environmental Factors. Reproduction 154: R111–R122. https://doi.org/10.1530/REP-17-0064
- Wang XJ, Walsh LP, Reinhart AJ, Stocco DM (2000) The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. J Biol Chem 275: 20204–20209. https://doi.org/10.1074/jbc.M003113200
- Yazawa H, Sasagawa I, Nakada T (2000) Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. Hum Reprod 15: 1917–1920. https://doi.org/10.1093/humrep/15.9.1917
- Gao HB, Tong MH, Hu YQ, You HY, Guo QS, Ge RS, Hardy MP (2003) Mechanisms of gluco-corticoidinduced Leydig cell apoptosis. Mol Cell Endocrinol 199: 153–163. https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00290-3
- Dong Q, Salva A, Sottas CM, Niu E, Holmes M, Hardy MP (2004) Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. J Andrology 25: 972–981. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb03170.x
- 22. Ren L, Zhang Y, Xin Y, Chen G, Sun X, Chen Y, He B (2021) Dysfunction in Sertoli cells participates in glucocorticoid induced impairment of spermatogenesis. Mol Reprod Dev 88: 405–415. https://doi.org/10.1002/mrd.23515
- Crisostomo L, Alves MG, Gorga A, Sousa M, Riera MF, Galardo MN, Meroni SB, Oliveira PF
 (2018) Molecular mechanisms and signaling pathways involved in the nutritional support of spermatogenesis by Sertoli cells. Methods Molecul Biol 1748: 129–155. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7698-0 11

The Effect of Prenatal Stress on the Reproductive Functions of Male Rats

S. G. Pivina^a, V. V. Rakitskaya^a, V. K. Akulova^a, G. I. Kholova^a, E. D. Shigalugova^a, and N. E. Ordyan^a, *

^a Pavlov Institute of Physiology Russian Academy Science, St.-Petersburg, Russia *e-mail: neo@infran.ru

Glucocorticoids inhibit testosterone production by Leydig cells by interacting with glucocorticoid receptors localized in these steroid-producing cells. Adult prenatally stressed (PS) male rats along with an increased plasma level of corticosterone, also demonstrate an increased level of testosterone, which may be due to a decrease in glucocorticoid receptors level in Leydig cells. This study is aimed at testing this hypothesis. We determined the level of glucocorticoid receptors in Leydig cells using quantitative immunohistochemistry. In addition, we examined the indicators of spermatogenesis and sperm quality, as well as reproductive potential of PS males. We found a decrease in the number of spermatogenic cells in the testis sprematogenic epithelium of PS males, despite the increased plasma level of testosterone. The morphometric parameters of the seminiferous tubules, such as thickness and area of the spermatogenic epithelium in male PS were increased, as well as the number of Sertoli cells and their area. We found a significant increase in the number of abnormal and immotile spermatozoa isolated from the epididymis of PS males. The number of Leydig cells in the interstitial tissue of the testes in PS males was reduced, as well as the level of glucocorticoid receptors in the Leydig cells in comparison with control males. However, these changes did not affect the ability of PS males to fertilize females and produce offspring. We suggested that the increased plasma testosterone level in PS male is due to a decrease in the sensitivity of Leydig cells to glucocorticoid hormones.

Keywords: prenatal stress, testis, spermatogenesis, Leydig cells, glucocorticoid receptors, rat