

ISSN 1027-8133

Том 41, Номер 4

Октябрь – Ноябрь – Декабрь
2024



НЕЙРОХИМИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 4, 2024

Специальный выпуск памяти Н. Н. Дыгало

(спецвыпуск, часть 2)

Редакторы Г. Т. Шишкина, Т. С. Калинина

Воспоминания о встречах с Николаем Николаевичем Дыгало

Л. П. Филаретова

313

Друзья мои, прекрасен наш союз!

Е. В. Савватеева-Попова

317

Обзоры

Ингибирование синтеза глюкокортикоидных гормонов метирапоном как подход для исследования их вклада в гастропротекцию у крыс

Л. П. Филаретова

320

Современные представления о роли стриатумспецифичной протеинтирозинфосфатазы STEP в регуляции патологических и нейродегенеративных процессов в мозге

В. С. Москалюк, А. В. Куликов, В. С. Науменко, Е. А. Куликова

331

Микробиота кишечника как модулятор постстрессорного нейровоспаления: методологические ограничения существующих исследовательских практик

И. Г. Шалагинова, С. П. Лузикова, А. Э. Вылегжанина, Д. С. Кацеров

344

Экспериментальные работы

Активация симпатoadреналовой системы при действии миметика глюкагоноподобного пептида-1 у крыс

Е. В. Балботкина, А. С. Марина, А. В. Кутина

352

Влияние различных видов стресса матери на состояние некоторых компонентов редокс-системы мозга у самцов и самок крыс на 20-й день эмбрионального периода развития

А. В. Вьюшина, А. В. Притворова, С. Г. Пивина, В. К. Акулова, Н. Э. Ордян

362

Развитие признаков болезни Альцгеймера у крыс Охус сопровождается снижением экспрессии дофаминавого нейротрофического фактора мозга (CDNF) и не компенсируется его сверхэкспрессией

*Я. П. Каминская, Т. В. Ильчибаева, Т. А. Козлова, Н. Г. Колосова,
В. С. Науменко, А. С. Цыбко*

372

Двигательная разгрузка задних конечностей вызывает апоптоз и аутофагию, но не нейродегенерацию в гиппокампе крыс

*Е. А. Олейник, А. С. Березовская, А. А. Куликов, С. А. Тыганов, А. А. Наумова,
Е. В. Черниговская, Б. С. Шенкман, М. В. Глазова*

384

Меланокортиновая система мозга крыс линии Крушинского—Молодкиной с генетической предрасположенностью к аудиогенным судорогам

И. В. Романова, А. Л. Михрина, С. И. Ватаев

393

Долгосрочная память: роль света и обучения в преодолении стресса у *Drosophila Melanogaster*

Е. В. Токмачева, А. В. Медведева, Б. Ф. Щеголев, Е. А. Никитина, Е. В. Савватеева-Попова

403

Клиническая нейрохимия

Изменение концентрации катехоламинов в крови как фактор риска развития атеросклеротического поражения сосудов у детей с семейной гиперхолестеринемией

*Р. Р. Нигматуллина, Д. И. Садыкова, К. Р. Салахова,
Е. С. Слестникова, Л. Р. Хуснутдинова*

410

Регулярные статьи

Экспериментальные работы

Сигнал эволюционного отбора в гене c-kit ligand связан с регуляцией нейропластичности глюкокортикоидами: новый взгляд на механизмы доместикации

*А. К. Пискунов, В. Н. Воронкова, Э. А. Солошенкова, Н. Ю. Саушкин,
Ж. В. Самсонова, Ю. А. Столповский*

421

Клиническая нейрохимия

Количественный и качественный анализ экзосом сыворотки крови на разных сроках после ишемического инсульта

М. Ю. Жанина, Т. А. Дружкова, А. А. Яковлев, А. Б. Гехт, Н. В. Гуляева

435

Нина Константиновна Попова (10.02.1929–28.09.2024)

448

CONTENTS

Vol. 41, no. 4, 2024

Special Issue: A Tribute to Nikolay N. Dygalo

(Special Issue, Part 2)

Eds. G. T. Shishkina and T. S. Kalinina

Memories of Meetings with Nikolay Nikolaevich Dygalo <i>L. P. Filaretova</i>	313
My Friends, is Wonderful Our Union! <i>E. V. Savvateeva-Popova</i>	317

Review Articles

Inhibition of Glucocorticoid Synthesis by Metyrapone as an Approach to Study Their Contribution to Gastroprotection in Rats <i>L. P. Filaretova</i>	320
Current Concepts of the Role of Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase STEP in the Pathological and Neurodegenerative Processes in the Brain <i>V. S. Moskaliuk, A. V. Kulikov, V. S. Naumenko, and E. A. Kulikova</i>	331
Gut Microbiota as a Modulator of Post-Stress Neuroinflammation: Methodological Limitations of Existing Research Practices <i>I. G. Shalaginova, S. P. Luzikova, A. E. Vylegzhanina, and D.S. Katserov</i>	344

Experimental Articles

Activation of the Sympathoadrenal System under the Influence of Glucagon-Like Peptide-1 Mimetic in Rats <i>E. V. Balbotkina, A. S. Marina, and A. V. Kutina</i>	352
The Effect of Various Types of Mother Stress on the Some Components of the Brain Redox System in Male and Female Rats on the 20th Day of the Embryonic Development Period <i>A. V. Vyushina, A. V. Pritvorova, S. G. Pivina, V. K. Akulova, and N. E. Ordyan</i>	362
The Development of Signs of Alzheimer's Disease in OXYS Rats is Accompanied by a Decrease in the Expression of Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF), and is not Compensated by Its Overexpression <i>Ya. P. Kaminskaya, T. V. Ilchibaeva, T. A. Kozlova, N. G. Kolosova, V. S. Naumenko, and A. S. Tsybko</i>	372
Hindlimb Unloading Induces Apoptosis and Autophagy but not Neurodegeneration in the Hippocampus of the Rats <i>E. A. Oleynik, A. S. Berezovskaya, A. A. Kulikov, S. A. Tyganov, A. A. Naumova, E. V. Chernigovskaya, B. S. Shenkman, and M. V. Glazova</i>	384
Analysis of the Melanocortin Brain System of a Krushinsky–Molodkina Rats with Genetic Predisposition to Audiogenic Seizures <i>I. V. Romanova, A. L. Mikhrina, and S. I. Vataev</i>	393
Long-Term Memory: The Role of Light and Learning in Coping with Stress in <i>Drosophila Melanogaster</i> <i>E. V. Tokmacheva, A. V. Medvedeva, B. F. Schegolev, E. A. Nikitina, and E. V. Savvateeva-Popova</i>	403

Clinical Neurochemistry

Changes in the Concentration of Catecholamines in the Blood as a Risk Factor for the Development of Atherosclerotic Vascular Damage in Children with Family Hypercholesterolemia

*R. R. Nigmatullina, D. I. Sadykova, K. R. Salakhova, E. S. Slastnikova,
and L. R. Khusnutdinova*

410

Regular Articles

Experimental Articles

Selection Signal in C-Kit Ligand Gene Linked to Glucocorticoid-Regulated Neuroplasticity: a New Angle on Domestication Mechanisms

*A. K. Piskunov, V. N. Voronkova, E. A. Soloshenkova, N. Yu. Saushkin,
Zh. V. Samsonova, and Yu. A. Stolpovsky*

421

Clinical Neurochemistry

Quantitative and Qualitative Analysis of Serum Exosomes at Different Stages after Ischemic Stroke

M. Yu. Zhanina, T. A. Druzhkova, A. A. Yakovlev, A. B. Guekht, and N. V. Gulyaeva

435

Nina Konstantinovna Popova (February 10, 1929–September 28, 2024)

448

ВОСПОМИНАНИЯ О ВСТРЕЧАХ С НИКОЛАЕМ НИКОЛАЕВИЧЕМ ДЫГАЛО

© 2024 г. Л. П. Филаретова¹, *

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

*E-mail: filaretovalp@infran.ru

Поступила в редакцию 02.08.2024 г.

После доработки 05.08.2024 г.

Принята к публикации 07.08.2024 г.

В статье, посвященной памяти Николая Николаевича Дыгало, автор вспоминает о встречах с ним на конференциях и симпозиумах на протяжении 40-летнего научного пути в эндокринологии и изучении проблемы стресса. Первая встреча состоялась в 1981 г. на Всесоюзном симпозиуме “Эндокринные механизмы регуляции приспособления организма к мышечной деятельности” в Тарту. Последняя встреча — 6 декабря 2023 г. на Всероссийской конференции с международным участием “Интегративная физиология-2023”, на которой Николай Николаевич выступил с приглашенным докладом. Продолжительное и дружеское общение с Николаем Николаевичем было предопределено добрым и уважительным отношением друг к другу учителей — Евгения Владимировича Науменко и Анатолия Аркадьевича Филаретова, оба из которых имели общий научный интерес к исследованию ключевой гормональной системы стресса — гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. Николай Николаевич остается в памяти человеком, увлеченным наукой, всегда напористым устремленным к новым достижениям, сохранившим задор молодых лет, с которым всегда было жизнерадостно общаться.

Ключевые слова: Н.Н. Дыгало, Е.В. Науменко, А.А. Филаретов, эндокринология, стресс, гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система, глюкокортикоидные гормоны, конференции и симпозиумы

DOI: 10.31857/S1027813324040014, EDN: ENKBHY

Прошло несколько месяцев с того дня (1 апреля 2024 г.), когда так внезапно ворвалась в жизнь многих из нас трагическая новость о том, что “не стало Николая Николаевича Дыгало”, но, по-прежнему, трудно осознать и принять это. Читаешь название письма, открываешь его и видишь Николая Николаевича на фотографии, так удачно запечатлевшей его взгляд с доброжелательной улыбкой, столь знакомой более 40 лет. Как хочется думать, что он все там же в Академгородке, и впереди будут новые встречи.

Последняя встреча — 6 декабря 2023 г. на нашей Всероссийской конференции с международным участием “Интегративная физиология-2023”. Мы пригласили Николая Николаевича выступить с Пленарным докладом в день открытия конференции [1]. Доклад на тему “Аспекты глутаматергической нейротрансмиссии в регуляции нейрорхимических и поведенческих ответов на стресс” прозвучал очень ярко. Николай Николаевич выступил с присущей ему напористостью, при которой речь звучала эмоционально с желанием убедить всех в том, чем

хотел поделиться. Поделился результатами работы своего коллектива, убедительно свидетельствующими “о существенном изменении регуляторной функции глутаматергической системы мозга в условиях стресса, а также о возможности влияния на поведение путем направленного воздействия на активность глутаматергических нейронов префронтальной коры и гиппокампа”. Как всегда, результаты получены при использовании самых современных методов, которые Николай Николаевич одним из первых смело и успешно внедрял. Хочу специально обратить внимание на слова, прозвучавшие в начале доклада, о важности развития интегративной физиологии, о необходимости использования целостного подхода: “Интегративная физиология — это то, к чему мы всегда стремимся и на кафедре, и в лаборатории”. Для желающих послушать этот доклад, к счастью, сохранилась эта возможность. На запись пленарных докладов конференции можно выйти по ссылке (доклад Н.Н. Дыгало начинается с 1:40:25) https://www.infran.ru/meetings/2023-Integrative-Physiology/06_12_2023-Open_and_Plenary_Doklady.mp4.

Возможно, это был последний доклад Николая Николаевича на конференции или, по крайней мере, один из последних. Несомненно, это было выступление зрелого ученого, за плечами которого — успешный путь в науке, начало которого пришлось на конец 70-х годов прошлого века. Достойное продолжение пути своего учителя — Евгения Владимировича Науменко.

Практически в начале этого пути мы и познакомились. Память хранит нашу первую встречу, в 1981 г. в Тарту на Всесоюзном симпозиуме “Эндокринные механизмы регуляции приспособления организма к мышечной деятельности”, организованной Атко Аугустовичем Виру. Не сохранилось фотографий этого симпозиума (как фотографий многих других конференций, по которым легко вспомнить участников), тем не менее, хорошо помню, что молодой человек с необычной фамилией Дыгало пригласил меня, молодую участницу, танцевать на мероприятии в рамках культурной программы этого симпозиума. После этой первой встречи на протяжении четырех десятилетий было много других встреч на Всесоюзных конференциях в разных городах, с наиболее частыми встречами в Ленинграде/Петербурге на наших конференциях, не столь частыми, но хорошо сохранившимися в памяти, в Академгородке, атмосфера которого и люди, работающие там в науке, всегда вызвала у меня восхищение. Всегда воспринимала Академгородок как удивительный оазис науки. Помню и теплые встречи в гостеприимном доме Николая Николаевича и Галины Трифионовны. Неоднократно встречались с Николаем Николаевичем, Галиной Трифионовной и сотрудниками его лаборатории на Международном симпозиуме “Symposium on Catecholamines and Other Neurotransmitters in Stress” в чудесном замке (the Smolence Castle) под Братиславой, которые в течение нескольких десятилетий организовывал проф. Ричард Кветнянский, а позднее проф. Даниэла Йезова. Последний раз — в июне 2019 года на “12th Symposium on Catecholamines and Other

Neurotransmitters in Stress”. Мы оба с Николаем Николаевичем были членами Международного Оргкомитета этого симпозиума и приглашенными докладчиками. Николай Николаевич выступал с докладом “Expression of glutamate signaling genes associated with stress vulnerability or resilience” [2]. Тема моего доклада — “Stress, glucocorticoids and gastrointestinal diseases” [3]. С научными докладами выступали и сотрудники наших лабораторий [4, 5].

Последние два десятилетия прошлого века, особенно 1980–1995 гг., — время регулярного общения эндокринологов в нашей стране со встречами на конференциях и симпозиумах в разных городах: Ленинград/Петербург, Москва, Иваново (рис. 1), Харьков, Академгородок. Однако, далеко не со всеми участниками этих встреч сохранилось такое дружеское общение длиной в целую жизнь в науке. Думаю, что прежде всего, наше продолжительное общение с Николаем Николаевичем было предопределено добрым и уважительным друг к другу отношением наших учителей — Евгения Владимировича Науменко и Анатолия Аркадьевича Филаретова. Оба имели общий научный интерес к исследованию ключевой гормональной системы стресса — гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. Безусловно, и Николаю Николаевичу, и мне повезло в жизни встретить таких Учителей, учивших нас, прежде всего, своим собственным примером отношения к науке. С Евгением Владимировичем и его учениками всегда была рядом и Нина Константиновна Попова. К обоим из них сохранилось тепло в моей душе и благодарность.

В 1990 г. А.А. Филаретов организовал в Ленинграде международный симпозиум “Физиология гипофизарно-адренокортикальной системы” по тематике, которой занимались обе лаборатории. Конечно, в симпозиуме принимал активное участие Евгений Владимирович Науменко с сотрудниками своей лаборатории, в том числе, и Николаем Николаевичем, а также Аркадий Львович Маркель (рис. 2–3). Интересно обратиться



Рис. 1. II Всесоюзная конференция по нейроэндокринологии, Иваново, 1982. Н.Н. Дыгало — в центре, рядом с А.А. Филаретовым.



Рис. 2. Международный симпозиум “Физиология гипоталамо-адренкортикальной системы”, Ленинград, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 1990. У здания института. Слева направо: Т.Р. Багаева, Л.П. Филаретова, Н.Н. Дыгало, проф. Махо (Братислава), участник симпозиума, Даниэла Йезова (Братислава), А.А. Филаретов, Ю.Г. Балашов.

к названиям их докладов для напоминания тематики исследований тех лет. Е.В. Науменко выступил с докладом “Современные представления о регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы серотонином” [6], Н.Н. Дыгало — “Реакция адренкортикальной системы при эмоциональном стрессе: роль норадреналиновой системы мозга” [7], А.Л. Маркель — “Артериальное давление как фактор регуляции адренкортикальной функции по механизму отрицательной обратной связи” [8]. Прозвучали доклады сотрудников

лаборатории “Состояние гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной функции при наследственной артериальной гипертензии у крыс и пути ее длительной модификации путем воздействий в раннем онтогенезе” [9], “Об участии моноаминоксидаз мозга в реакции на стресс” [10], “Дифференцирующее влияние стресса на формирование иерархической структуры популяции” [11], “Реактивность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при эмоциональном стрессе и адаптация диких животных к условиям неволи” [12]. Таким богатым был вклад в научную программу симпозиума.

Наши пути в науке с Николаем Николаевичем перекликаются еще и печальными вехами. Оба из нас рано потеряли своих учителей. Евгения Владимировича Науменко не стало в 1994 г., Анатолия Аркадьевича Филаретова — в 1996 г. Оба из нас приняли эстафету от своих учителей и возглавили лаборатории. Е.В. Науменко в последние месяцы жизни передал лабораторию, которую создал и которой руководил в течение 37 лет, своему ученику, доктору биологических наук Н.Н. Дыгало. Николай Николаевич очень достойно продолжил дело своего учителя. Рядом с ним на этом пути были ученики Евгения Владимировича Лариса Николаевна Маслова, Галина Трифоновна Шишкина. Николай Николаевич оставил своим коллегам и своим ученикам успешную современную лабораторию с созданными им новыми научными направлениями, свой опыт и пример своего страстного отношения к науке. Ему удалось приумножить научный багаж, переданный Евгением Владимировичем, его он и оставил своим замечательным коллегам и ученикам. В моей памяти Николай Николаевич остается человеком, увлеченным наукой, всегда напористо устремленным к новым достижениям, сохранившим задор молодых лет, с которым всегда было жизнерадостно общаться.



Рис. 3. Международный симпозиум “Физиология гипоталамо-адренкортикальной системы”, Ленинград, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 1990. В конференц-зале института. Слева направо: В.Г. Шаляпина, А.Л. Маркель, Е.В. Науменко, Даниэла Йезова, А.А. Виру (Тарту), Ю.И. Баженов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дыгало Н.Н.* // В сб.: Всероссийская конференция с международным участием “Интегративная физиология”. Санкт-Петербург. 2023. С. 6.
2. *Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T.* // Abstract Book: Twelfth symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress. Smolenice Castle. Slovakia. 2019. P. 19.
3. *Filaretova L.* // Abstract Book: Twelfth symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress. Smolenice Castle. Slovakia. 2019. P. 22.
4. *Shishkina G.T., Kalinina T.S., Bannova A.V., Ayriyants K.A., Dygalo N.N.* // Abstract Book: Twelfth symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress. Smolenice Castle. Slovakia. 2019. P. 47.
5. *Iarushkina N., Sudalina M., Filaretova L.* // Abstract Book: Twelfth symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress. Smolenice Castle. Slovakia. 2019. P. 31.
6. *Науменко Е.В.* // В сб.: Физиология гипофизарно-адренокортикальной системы. Ленинград. 1990. С. 85–86.
7. *Дыгало Н.Н.* // В сб.: Физиология гипофизарно-адренокортикальной системы. Ленинград. 1990. С. 65–66.
8. *Маркель А.Л.* // В сб.: Физиология гипофизарно-адренокортикальной системы. Ленинград. 1990. С. 77–78.
9. *Маслова Л.Н., Маркель А.Л., Науменко Е.В.* // В сб.: Физиология гипофизарно-адренокортикальной системы. Ленинград. 1990. С. 79–80.
10. *Попова Н.К., Войтенко Н.Н., Маслова Л.Н.* // В сб.: Физиология гипофизарно-адренокортикальной системы. Ленинград. 1990. С. 89–90.
11. *Серова Л.И., Сахаров Д.Г., Науменко Е.В.* // В сб.: Физиология гипофизарно-адренокортикальной системы. Ленинград. 1990. С. 31–32.
12. *Шишкина Г.Т.* // В сб.: Физиология гипофизарно-адренокортикальной системы. Ленинград. 1990. С. 37–38.

Memories of Meetings with Nikolay Nikolaevich Dygalo

L. P. Filaretova¹¹*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

In the article dedicated to the memory of Nikolay Nikolaevich Dygalo, the author recalls meetings with him at conferences and symposia over a 40-year scientific career in endocrinology and the study of stress. The first meeting took place in 1981 at the All-Union Symposium “Endocrine Mechanisms of Regulation of the Body’s Adaptation to Muscle Activity” in Tartu. The last meeting was on December 6, 2023, at the All-Russian Conference with international participation “Integrative Physiology-2023,” where Nikolay Nikolaevich gave an invited lecture. The long-lasting and friendly communication with Nikolay Nikolaevich was predestined by the kind and respectful relationship between their mentors – Evgeny Vladimirovich Naumenko and Anatoly Arkadyevich Filaretov – both of whom shared a common scientific interest in studying the key hormonal system of stress, the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. Nikolay Nikolaevich remains remembered as a person passionate about science, always vigorously striving for new achievements, retaining the enthusiasm of his youth, and with whom it was always joyful to communicate.

Keywords: N.N. Dygalo, E.V. Naumenko, A.A. Filaretov, endocrinology, stress, hypothalamic-pituitary-adrenocortical system, glucocorticoid hormones, conferences and symposia

УДК 577.21

ДРУЗЬЯ МОИ, ПРЕКРАСЕН НАШ СОЮЗ!

© 2024 г. Е. В. Савватеева-Попова¹, *

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

*E-mail: esavvateeva@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2024 г.

После доработки 13.08.2024 г.

Принята к публикации 15.08.2024 г.

Это история о том, как в тяжелые годы после сессии ВАСХНИЛ 1948 г. Ленинград и Новосибирск совместно спасали генетику, перезнакомили своих молодых ученых, и потому о роли каждого, в данном случае Николая Николаевича Дыгало, автор статьи может сказать словами А.С. Пушкина: “Мой первый друг, мой друг бесценный”.

Ключевые слова: Н.Н. Дыгало, генетика, нейрофизиология

DOI: 10.31857/S1027813324040021, **EDN:** ENJTPN

Александр Сергеевич Пушкин достаточно давно и прекрасно выразил Суть:

Друзья мои, прекрасен наш союз!

Он, как душа, неразделим и вечен —

Неколебим, свободен и беспечен,

Срастался он под сенью дружных муз.

Куда бы нас ни бросила судьбина

И счастье куда б ни повело,

Всё те же мы: нам целый мир чужбина;

Далее позволю чуть изменить текст: *Отечество оно у нас одно,*

это генетика. И если писать о Николае Николаевиче Дыгало, то эпиграфом следует взять опять же слова А.С. Пушкина: “Мой первый друг, мой друг бесценный”.

Мы — ученики тех, кто победил в битве за генетику после знаменитой сессии ВАСХНИЛ. Символами победы стали Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, наш ИЦиГ, и наш же Институт физиологии им. И.П. Павлова, Ленинград—Санкт-Петербург, ИФ РАН. О том, как эти сообщающиеся сосуды побеждали, можно прочитывать в книгах “Генетика прирастает Сибирью: первые два десятилетия Института цитологии и генетики СО АН СССР — начало и становление”, авторы Шумный В.К., Захаров И.К., Кикнадзе И.И., Иванова Л.Н., Попова Н.К., Дымшиц Г.М. [1], и “Сигнальная наследственность Михаила Ефремовича Лобашева: ученики и дети”, авторы Савватеева-Попова Е.В., Захаров-Гезехус И.А. [2].

Итак, имена со стороны ИЦиГ приведены, со стороны ИФ РАН это возвращенные Михаилом

Ефимовичем Лобашевым (первый учебник генетики после уничтожения оной) Нина Георгиевна Лопатина и Валентина Васильевна Пономаренко. Все вышеперечисленные дамы-профессора, кроме В.В. Пономаренко, здравствуют, но пока мы росли, заканчивали кафедру генетики и селекции ЛГУ, а потом пошли в ИФ РАН *ради павловского начертания на его лаборатории* в Колтушах “Генетика высшей нервной деятельности”, они оппонировали защиты своих учеников крисс-кросс.

Затем Н.К. Попова, В.В. Пономаренко и Н.Г. Лопатина решили устроить школу-семинар по генетике поведения в Звенигороде, дабы перезнакомить всех нас: Новосибирск—Ленинград. Было это где-то в году 1976-м или 1977-м.

Далее по продиктованным мне недавно словам Н.Г. Лопатиной — кто там был (без отчеств, мы же еще тогда юнцами были, отчеств друг друга не знали и время было *докомпьютерное*):

От ИФ РАН: Сергей Новиков, Лена Савватеева, Коля Камышев.

От ИЦиГ: Паша Бородин, Надя Бажан, Коля Дыгало.

И так, друзья, возник прекрасный наш союз!

Наша с Камышевым первая публикация совместно с Наташей Кудрявцевой, выполняли работу в ИЦиГ у Н.К. Поповой, сотрудничаем по сю пору. Еще у меня публикации с Е. Баричевой и Д. Карагодиным, Женей Каракиным.

И на последней фамилии я могу только процитировать:

“Ничто на Земле не проходит бесследно,

И юность ушедшая все же бессмертна”.

А вот с Колей Дыгало публикаций не было, но была жизнь в единении физиологии и генетики.

Я повторю это цитатой из моей рецензии на выше процитированную книгу “Генетика прирастает Сибирью”:

“Уже четвертое поколение генетиков с 1948 г., ведет борьбу за кадры. И, на мой взгляд — генетик не может стать генетиком, физиолог — не может стать современным нейрофизиологом, если он не поработал в ИЦиГ СО РАН, в Академгородке. Меняются названия, способы финансирования — но история борьбы за генетику показывает — при любых реалиях, молодежь других городов страны ДОЛЖНА поработать в ИЦиГ”.

О научных достижениях Николая Николаевича напишут другие, но следуя теме “Друзья, прекрасен наш союз”, мне следует сосредоточиться на “Мой первый друг, мой друг бесценный”. Да, мы выросли и росли с тех пор, как Новосибирск и Ленинград познакомили в Звенигороде, вместе. Наш диапазон “генетика — нейрофизиология — генетика поведения — молекулярная генетика” позволял нам участвовать в Съездах как Физиологического общества, так и ВОГИС, видется и там, и в Академгородке. По какому бы поводу мне ни приходилось бы там быть, я шла к Коле. Когда мы налаживали метод RT-PCR и возникали трудности, мои сотрудники в СПб кричали мне: “Быстро звони Дыгало”.

Сейчас, когда я спрашиваю мнения о Дыгало — мне отвечают, что он был очень закрытым человеком. Как бы не так, как бы не так! Мы с юности воспитаны одними и теми же учителями, поэтому дышали в унисон. Пара примеров.

В марте 2008 г. состоялся Russian-Japanese workshop on Neurobiology and Neurodynamics в известном RIKEN Институте рядом с Токио. Нас поселили в общежитии для аспирантов и пост-дочков, неведомый японский стиль, маленькие комнаты, в каждой даже кухня и все-все, общий вход длинный, но узкий балкон-галерея, наши номера с Колей были рядом. Кроме научной программы (доклады под зеленый чай на этом балконе мы делали вместе) были и длительные посещения Nikon и Hitachi. После этого в полном одиночестве мы обсуждали все под сакэ.

XXII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова состоялся 16–20 сентября 2013 г. в Волгограде, на базе Волгоградского государственного медицинского университета (рис. 1). Естественно, банкет при закрытии. Скучновато, на наш вкус, официоз, переходящий в танцы, но все не решаются танцевать, официоз же.

Все, но не мы с Колей. А чтобы танцевать нон-стоп и в любом ритме и жанре (чего никто не ожидал), требуется великолепное понимание партнерами друг друга. Мы завели зал, как



Рис. 1. XXII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова 16–20 сентября 2013 г. в Волгограде.

говорят — сработав на разогреве, и пошли передохнуть. И Коля сказал: “А знаешь, из всех присутствующих здесь, только ты помнишь меня кудрявым”. И мы вспомнили Звенигород середины 70-х, и то, что сделали Н.К. Попова, Н.Г. Лопатина, В.В. Пономаренко, дабы ИЦиГ и ИФ РАН перепознакомить НАВСЕГДА.

Да, танцами, при чувстве партнера, всегда можно преодолеть официоз. Так мы делали с Колей Камышевым (вспомним Звенигород) на чисто генетических форумах.

И вот *последнее*: 11–15 сентября 2023 г. в Санкт-Петербурге состоялся XXIV съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Да, программа была трудной, мы мало виделись. От Коли Камышева, переживавшего последствия неудачных операций, были его молодые сотрудники. Коля Дыгало меня потряс тем, что выглядит как Коля Камышев.

17 марта 2024 г. не стало Коли Камышева, в ожидании прилета сына хоронили позже, на следующий день — “Крокус Сити Холл”, вскоре — извещение о Коле Дыгало.

Вы заметили — я не говорю о смерти, поскольку “Ничто на Земле не проходит бесследно, а юность ушедшая все же бессмертна”.

И уже наступило время, когда они могут и будут помогать, главное — научиться их слышать.

Друзья мои, прекрасен наш союз...

Мой первый друг, мой друг бесценный.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шумный В.К., Захаров И.К., Кикнадзе И.И., Иванова Л.Н., Попова Н.К., Дымищ Г.М. Генетика прирастает Сибирью: первые два десятилетия Института цитологии и генетики СО АН СССР — начало и становление. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2012. 354 с.

2. Савватеева-Попова Е.В., Захаров-Гезехус И.А. Сигнальная наследственность Михаила Ефремовича Лобашева: ученики и дети / сост. И.А. Захаров-Гезехус. М.: КнигИздат, 2020. 214 с.

My Friends, is Wonderful Our Union!

E. V. Savvateeva-Popova¹

¹*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

This is a story about the resurrection of genetics after the notorious Session in 1948, the contribution of both Leningrad and Novosibirsk. They have made acquainted their young geneticists because of this the author of the article can say about them, especially of Nikolay Dygalo, with Pushkin's verse: "My first friend, my friend so priceless".

Keywords: N.N. Dygalo, genetics, neurophysiology

ИНГИБИРОВАНИЕ СИНТЕЗА ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ МЕТИРАПОНОМ КАК ПОДХОД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ВКЛАДА В ГАСТРОПРОТЕКЦИЮ У КРЫС

© 2024 г. Л. П. Филаретова^{1, *}

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

*E-mail: filaretovalp@infran.ru

Поступила в редакцию 29.07.2024 г.

После доработки 31.07.2024 г.

Принята к публикации 01.08.2024 г.

Согласно результатам наших исследований, глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на стрессорные ulcerогенные стимулы, являются гастропротективными факторами. Цель настоящей обзорной статьи — на примере анализа полученных данных показать, что ингибирование синтеза глюкокортикоидных гормонов метирапоном может быть адекватным и ценным подходом для изучения вклада глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при острой активации гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАКС), в гастропroteкцию у крыс. При оценке вклада глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся в ответ на умеренные, неulcerогенные в норме стрессоры или введение кортикотропин-релизинг фактора (КРФ), в гастропroteкцию было показано, что угнетение продукции этих гормонов метирапоном приводит к: 1) трансформации неulcerогенных в норме стимулов в ulcerогенные; 2) устранению гастропroteктивного эффекта стрессорного прекодиционирования; 3) устранению гастропroteктивного эффекта КРФ. Эффекты метирапона воспроизвелись в условиях угнетения продукции глюкокортикоидных гормонов селективным антагонистом КРФ рецепторов 1 типа NBI 27914 и при блокаде глюкокортикоидных рецепторов их антагонистом RU38486. Приведенные данные свидетельствуют о том, что: а) глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на умеренные стрессорные стимулы, вносят вклад в защиту слизистой оболочки желудка в этих условиях, а также повышают ее устойчивость к последующим ulcerогенным воздействиям (т.е. вносят вклад в гастропroteктивный эффект стрессорного прекодиционирования); б) глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на введение КРФ, принимают участие в реализации его гастропroteктивного действия. Полученные результаты подтверждают, что активация ГГАКС является гастропroteктивным компонентом стрессорной реакции, а глюкокортикоидные гормоны, при этом продуцирующиеся, важными гастропroteктивными факторами.

Ключевые слова: гастропroteкция, гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система, глюкокортикоидные гормоны, индометацин, кортикотропин-релизинг фактор, крысы, метирапон, стресс, стрессорное прекодиционирование, эрозии желудка

DOI: 10.31857/S1027813324040036, EDN: ENHJJA

ВВЕДЕНИЕ

Целостность слизистой оболочки желудка поддерживается за счет слаженной работы гастропroteктивных механизмов. Слизисто-бикарбонатный барьер, кровоток, регенерационные способности слизистой оболочки желудка относятся к ключевым из них [1–3]. В свою очередь, в их адекватной регуляции принимают участие разные гастропroteктивные факторы, среди которых хорошо известными являются простагландины (ПГ) [4], оксид азота (NO) [5] и пептиды, высвобождающиеся при активации капсаицин-чувствительных

нейронов (КЧН), которые являются афферентами с эфферентно-подобной функцией [6]. При этом ПГ, NO и КЧН действуют сообща, “в центре друг с другом” [7]. Глюкокортикоидные гормоны среди гастропroteктивных факторов долгое время не числились. Более того, они считались ulcerогенными факторами, то есть способствующими язвообразованию в желудке.

Исследование вопроса о влиянии глюкокортикоидных гормонов на язвообразование в желудке при стрессе было стимулировано открытием ключевой роли гипоталамо-адренкортикальной системы и, соответственно, глюкокортикоидных

гормонов, в стрессорной реакции организма и описанием классической триады стресса, которые были сделаны Гансом Селье [8]. Объединив в триаду стресса гипертрофию коры надпочечников и язвы желудка, Селье привлек внимание к причинно-следственной связи между ними и первым начал проверять в эксперименте, не являются ли глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся при стрессе, причиной стрессорного язвообразования в желудке, т.е. не являются ли они ulcerогенными гормонами. Результаты исследования, проведенного на гипофизэктомизированных и адреналэктомизированных крысах, привели Селье к заключению о том, что глюкокортикоидные гормоны не являются значимыми ulcerогенными факторами при стрессе [8].

Тем не менее, идея об ulcerогенных свойствах глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при стрессе, оставалась долгое время привлекательной для многих и со временем переросла в догму. В большой степени этому способствовало выявление побочного ulcerогенного влияния глюкокортикоидных гормонов при гормональной терапии [9] и последующая безосновательная экстраполяция ulcerогенных свойств экзогенных глюкокортикоидных гормонов на эндогенные гормоны, продуцирующиеся при стрессе. Представление об ulcerогенном влиянии стресс-индуцированных глюкокортикоидных гормонов оставалось стойким на протяжении нескольких десятилетий.

Для того, чтобы переоценить что-то, ставшее общепринятым, да еще в международном масштабе, требуются убедительные доказательства, а также определенная стойкость в их отстаивании под натиском неминуемого шквала неприятия и критики. В конце 80-х начале 90-х годов прошлого столетия мы получили первые результаты, свидетельствующие о том, что глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся при стрессе, вносят важный вклад в защиту слизистой оболочки желудка от ее повреждений при стрессе, т.е. являются гастропротективными факторами [10, 11]. Параллельно публикациям, изначально в российских журналах, были и доклады на конференциях о результатах, поддерживающих новую точку зрения на стресс-продуцирующиеся глюкокортикоидные гормоны как на важные факторы защиты слизистой оболочки желудка. Хотя конструктивная критика, несомненно, — важный инструмент, способствующий прогрессу исследований, тем не менее, критика деструктивная, да еще негативно окрашенная, не всегда легка для восприятия. Выбирая тему статьи для выпуска журнала, посвященного памяти Николая Николаевича Дыгало, вспоминала Николая Николаевича и его учителя Евгения Владимировича Науменко. Евгений Владимирович был одним из старших авторитетных коллег, оказавшим мне горячую поддержку после

прозвучавшей однажды после доклада критики. Следом за словами поддержки предложил добавить для этих исследований в качестве еще одного подхода ингибитор синтеза глюкокортикоидных гормонов метирапон и даже прислал мне на первую пробу небольшое количество препарата. Воспоминание об этом и определило мой выбор для темы статьи. Со временем мы начали активно использовать метирапон в своих многоплановых исследованиях. Этот подход позволил получить много важных результатов, поддерживающих гастропротективную роль глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при стрессе. Цель настоящей обзорной статьи — на примере анализа полученных в наших исследованиях данных показать, что ингибирование синтеза глюкокортикоидных гормонов метирапоном может быть адекватным и ценным подходом для изучения вклада глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при острой активации ГГАС, в гастропротекцию у крыс.

ГАСТРОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХСЯ В ОТВЕТ НА СТРЕССОРНОЕ УЛЬЦЕРОГЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Роль глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при стрессе, в стресс-индуцированном язвообразовании мы последовательно изучали в нескольких аспектах, используя разные подходы в экспериментах на крысах. Начали исследования с оценки роли тех глюкокортикоидных гормонов, которые продуцируются непосредственно при действии самого ulcerогенного стрессора, чтобы проверить могут ли они быть повинны в вызванном этим стрессором язвообразовании [10–12]. При этом использовали классический физиологический подход — угнетение функции системы, в нашем случае гипоталамо-гипофизарно-адренал-кортикальной системы (ГГАС), ответственной за продукцию глюкокортикоидных гормонов при стрессе, с последующей компенсацией угнетенной функции заместительной терапией кортикостероном (естественным для крыс глюкокортикоидным гормоном). Задача, которую ставили перед собой, заключалась в сравнении чувствительности слизистой оболочки желудка к ulcerогенному стрессорному воздействию у крыс с естественной (нормальной) продукцией кортикостерона в ответ на ulcerогенный стимул и угнетенной (недостаточной) продукцией кортикостерона. Важно специально отметить, что для угнетения стрессорной продукции гормонов мы использовали несколько методических подходов. Основными из них являлись: 1) разрушение паравентрикулярного ядра (ПВЯ) гипоталамуса — главного источника кортикотропин-рилизинг фактора (КРФ)-продуцирующих нейронов; 2) ингибирование синтеза

КРФ в ПВЯ гипоталамуса; 3) иммунонейтрализация АКТГ; 4) фармакологическая блокада ГГАС на уровне всех звеньев системы [10–12]. Отметим, что среди основных перечисленных подходов для угнетения стрессорной продукции глюкокортикоидных гормонов отсутствует адреналэктомия, поскольку, на наш взгляд, она не является адекватным для этой цели методом, что мы неоднократно обсуждали в наших статьях [12].

Повторение экспериментов с использованием разных подходов для угнетения стрессорной продукции кортикостерона и воспроизведение подобных результатов позволило нам убедиться, что регистрируемые эффекты действительно связаны с недостаточной продукцией кортикостерона у крыс во время стресса, а не чем-то иным, связанным со спецификой метода. Это же подтверждалось и с помощью заместительной гормональной терапии для крыс с недостаточной продукцией кортикостерона, которая заключалась во введении перед началом стрессорного ulcerогенного воздействия кортикостерона в специально подобранной дозе, имитирующей естественный нормальный стрессорный подъем уровня гормона в крови. В качестве стрессорного ulcerогенного стимула использовали 3 ч иммобилизацию при холоде или при погружении крыс в охлажденную воду (cold restraint or water immersion restraint) на фоне 24 ч голодания.

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что крысы с угнетенной стрессорной продукцией кортикостерона во время действия ulcerогенного стимула отличаются наибольшей чувствительностью слизистой оболочки желудка к его повреждающему действию, о чем свидетельствовало усугубление стресс-индуцированного язвообразования [10–12]. Заместительная терапия кортикостероном предотвращала или существенно уменьшала это усугубление. Подобное усугубление стресс-индуцированного язвообразования мы обнаружили и при блокаде глюкокортикоидных рецепторов их специфическим антагонистом RU-38486 [12, 13]. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гастропротективной роли глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся в ответ на стрессорное ulcerогенное воздействие и, соответственно, не поддерживают их ulcerогенную роль [10–16].

Дополнительно к гастропротективной роли глюкокортикоидных гормонов в язвообразовании, индуцированном классическими стрессорами, мы выявили гастропротективную роль глюкокортикоидов, продуцирующихся при действии и других ulcerогенных стимулов: индометацина и аспирина [17–20], ишемии-реперфузии желудка [21]. При этом мы впервые обнаружили и сам факт активации ГГАС при ulcerогенном действии этих стимулов [18, 19].

При исследовании механизмов гастропротективного действия глюкокортикоидных гормонов было показано, что оно может опосредоваться благотворным влиянием гормонов на ключевые механизмы защиты слизистой оболочки желудка: кровотока, слизистый барьер, регенерационные способности [22–24], то есть на те “мишени”, через которые опосредуется и гастропротективное действие ПГ, NO, КЧН [25]. Это обстоятельство позволило нам предположить возможное взаимодействие глюкокортикоидных гормонов с этими защитными факторами при гастропротекции. Результаты проведенных исследований подтвердили это предположение: они показали способность глюкокортикоидных гормонов оказывать компенсаторное гастропротективное влияние в условиях недостаточного действия других защитных факторов [26]. Эти находки усиливают аргументы в пользу важного вклада глюкокортикоидных гормонов в гастропротекцию.

Приведенные результаты свидетельствуют о важной гастропротективной роли глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при активации ГГАС в ответ на ulcerогенные воздействия. Со временем результаты наших исследований привели к тому, что глюкокортикоидные гормоны появились в списке гастропротективных факторов со ссылками на наши публикации [27].

Продукция глюкокортикоидных гормонов повышается в ответ на действие стимулов различной модальности и интенсивности, в том числе и в ответ на умеренные стимулы, не приводящие к патологическим изменениям. Возникает вопрос о возможном вкладе и этих гормонов в гастропротекцию. Анализ результатов, полученных при исследовании этого вопроса, приведен в следующем разделе.

ГАСТРОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХСЯ В ОТВЕТ НА УМЕРЕННОЕ СТРЕССОРНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ И ВВЕДЕНИЕ КРФ

Одним из важных аспектов развития наших исследований является направленный на проверку возможности вклада в гастропротекцию тех глюкокортикоидных гормонов, которые продуцируются в ответ на умеренные, неulcerогенные, стимулы. Для проверки этой возможности исследования проводили в нескольких направлениях, при этом оценивали и сравнивали: а) эффекты умеренных, неulcerогенных в норме стимулов на слизистую оболочку желудка у крыс с естественной (нормальной) продукцией глюкокортикоидных гормонов в ответ на эти стимулы и у крыс с угнетенной продукцией этих гормонов; б) гастропротективное действие стрессорного прекодиционирующего

воздействия у крыс с нормальной продукцией глюкокортикоидных гормонов в ответ на это воздействие и у крыс с угнетенной продукцией этих гормонов; в) гастропротективное влияние экзогенного КРФ у крыс с нормальной продукцией глюкокортикоидных гормонов в ответ на введение КРФ и у крыс с угнетенной продукцией этих гормонов.

Для угнетения стрессорной продукции глюкокортикоидных гормонов в этих исследованиях особенно востребованным оказался подход с использованием ингибитора синтеза кортикостерона метирапона. Преимущество этого подхода заключается в том, что метирапон может оказывать кратковременное и, как показали результаты наших исследований, “неглубокое”, но значимое для проявления эффектов угнетение стрессорной продукции кортикостерона у крыс, что как раз и требовалось для выяснения поставленных вопросов.

Механизм угнетения продукции глюкокортикоидных гормонов метирапоном связан с его ингибирующим действием на фермент 11-β гидроксилаза, который катализирует превращение 11-дезоксикортикостерона в кортизол/кортикостерон [28, 29]. Метирапон используется как в клинике, так и в экспериментальных исследованиях на животных. В клинике метирапон активно используется для лечения пациентов с Кушинг синдромом, он рассматривается как препарат, способный контролировать гиперкортицизм эффективно, на длительный срок с высоким уровнем безопасности [28, 30, 31]. Область применения метирапона в экспериментальных исследованиях на крысах и мышах достаточно широка, при этом активное применение метирапона наблюдается в исследованиях, связанных с изучением роли глюкокортикоидных гормонов в поведении, памяти [29, 32–35].

Метирапон использовался для изучения роли глюкокортикоидных гормонов в стресс-индуцированном язвообразовании у крыс много лет назад, при этом не было обнаружено его эффекта на язвообразование [36].

Неульцерогенные стимулы трансформируются в ulcerогенные в условиях угнетенной продукции глюкокортикоидных гормонов метирапоном. Мы предположили, что глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на умеренные стрессорные стимулы, вносят вклад в защиту слизистой оболочки желудка в этих условиях. Проверая предположение, выясняли, изменяется ли чувствительность слизистой оболочки к этим стимулам в условиях угнетенной продукции глюкокортикоидных гормонов. Для этого сравнивали эффекты умеренных стрессорных стимулов на слизистую оболочку желудка у крыс с нормальной продукцией глюкокортикоидных гормонов в ответ на эти стимулы и у крыс с угнетенной продукцией этих гормонов.

В качестве неульцерогенного стрессорного стимула использовали кратковременную (15 мин) иммобилизацию крыс при холоде (cold restraint) на фоне 24 ч голода крыс. Для угнетения стрессорной продукции кортикостерона использовали метирапон, что являлось наиболее приемлемым в этих условиях подходом, прежде всего, из-за быстро развивающегося после его введения ингибирующего эффекта [33]. В этом случае мы избегали продолжительного ингибирования продукции гормонов до начала эксперимента, которое само по себе могло влиять на результат.

Для угнетения продукции кортикостерона в ответ на 15 мин иммобилизацию при холоде метирапон вводили в дозе 30 мг/кг за 30 мин до начала иммобилизации [37]. Доза метирапона была выбрана на основании данных литературы [33], схема введения препарата — на основании результатов пилотных исследований. Контрольным крысам вводили растворитель метирапона.

У контрольных крыс кратковременная (15 мин) иммобилизация на фоне предварительного 24 ч голодания вызывала резкое повышение уровня кортикостерона в крови, при этом у них не наблюдалось видимых поражений слизистой оболочки желудка. Введение метирапона приводило к угнетению, но не устранению стресс-индуцированного уровня кортикостерона в крови и появлению видимых эрозивных поражений слизистой оболочки [37]. Полученные данные свидетельствуют о том, что без нормального естественного повышения уровня кортикостерона в крови при стрессе слизистая оболочка желудка может быть уязвима даже при действии умеренных стрессоров. Согласно полученным результатам угнетение стресс-индуцированного уровня кортикостерона метирапоном приводит к тому, что неульцерогенные в норме стимулы становятся в этом случае ulcerогенными. Это заключение поддерживают данные, полученные нами и при угнетении стрессорного повышения уровня кортикостерона в крови другими способами: селективным антагонистом КРФ рецепторов 1 типа (КРФ-1 рецепторы) NBI 27914 или фармакологической гормональной блокадой ГГКС [37]. Воспроизведение в общем виде результатов, полученных при ингибировании стрессорной продукции кортикостерона метирапоном, в условиях ее ингибирования другими способами повышает надежность сделанного заключения. Таким образом, полученные данные подтверждают наше предположение о том, что глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на умеренные стрессорные стимулы, вносят вклад в защиту слизистой оболочки желудка в этих условиях.

Выявленный факт трансформации неульцерогенных в норме стрессорных стимулов в ulcerогенные при угнетении стресс-индуцированного уровня кортикостерона находится в соответствии

с ранее полученными нами данными о том, что неульцерогенные в норме стимулы такие как 20% этанол (per os) или аспирин (неульцерогенная доза, внутрибрюшинно) вызывают повреждение слизистой оболочки желудка у адреналэктомированных крыс [38]. Вместе с тем, результаты, полученные в стрессорных моделях с использованием краткосрочного и прицельного угнетения стрессорной продукции кортикостерона (с помощью метирапона, а также селективного антагониста КРФ-1 рецепторов NBI 27914), позволяют сделать заключение о вкладе в гастропротекцию именно стрессорной продукции кортикостерона [37].

Доза метирапона (30 мг/кг), выбранная на основании публикации наших венгерских коллег [33], является меньшей по сравнению с дозами метирапона, наиболее часто используемыми в экспериментах для ингибирования продукции кортикостерона у крыс [29, 32, 34, 39]. Меньшую дозу метирапона мы предпочли использовать как наиболее адекватную для решения нашей задачи с точки зрения степени угнетения стрессорного ответа (частичного, примерно 50%) и кратковременности эффекта. По этим же причинам мы использовали эту дозу метирапона (30 мг/кг) и для решения других поставленных задач, о которых речь пойдет в следующих разделах.

Гастропротективный эффект стрессорного преко́ндиционирования: исследование вклада глюкокортикоидных гормонов путем угнетения их продукции метирапоном. Согласно результатам, представленным в предыдущем разделе, без нормального естественного повышения стрессорного уровня кортикостерона в крови в ответ на умеренные стрессоры слизистая оболочка желудка может быть уязвима даже при их действии. Приведенные данные поддерживают предположение о возможности постоянного вклада в гастропротекцию глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся в ответ на умеренные стимулы, с которыми организм сталкивается постоянно. Возникает следующий вопрос, значимо ли это кратковременное повышение стрессорного уровня глюкокортикоидных гормонов в крови, индуцированное умеренными стимулами, для повышения устойчивости слизистой оболочки желудка к последующим ulcerогенным воздействиям. Вопрос является принципиальным для понимания механизмов гастропротективного эффекта стрессорного преко́ндиционирования, суть которого заключается в том, что умеренные стрессорные стимулы могут защищать слизистую оболочку желудка от последующих ulcerогенных воздействий [40]. Если кратковременное повышение стрессорного уровня глюкокортикоидных гормонов в крови, индуцированное умеренными стимулами, значимо для повышения устойчивости слизистой оболочки желудка к последующим ulcerогенным стимулам, то, следовательно, эти

гормоны вносят вклад в гастропротективный эффект стрессорного преко́ндиционирования.

Феномен стрессорного преко́ндиционирования заключается в том, что умеренные стрессорные стимулы повышают устойчивость организма и его систем к последующим повреждающим воздействиям. Хотя защитный эффект стрессорного преко́ндиционирования продемонстрирован и в отношении желудка [41–44], нельзя сказать, что он изучается интенсивно. Более активный интерес исследователей вызывает преко́ндиционирование ишемией-реперфузией, как локальной, так и дистантной по отношению к желудку, изучением которой мы также занимаемся [21, 45]. Одной из возможных причин не очень интенсивных исследований в моделях стрессорного преко́ндиционирования, но далеко не единственной, может являться сложность воспроизведения гастропротективного эффекта стрессорного преко́ндиционирования. Не в любой комбинации этих двух воздействий (умеренного стрессора и ulcerогенного стимула) удастся воспроизвести защитный эффект на слизистую оболочку желудка. В исследовании наших японских коллег с нашим участием [43] экспериментальным путем выявлена зависимость гастропротективного эффекта стрессорного преко́ндиционирования от продолжительности действия умеренного стрессора и временного интервала между двумя воздействиями [43]. При этом подобрана хорошо работающая модель для воспроизведения гастропротективного эффекта стрессорного преко́ндиционирования: умеренный стимул — 30 мин иммобилизация при холоде (cold restraint, 10 °C), 60 мин сохраняющаяся иммобилизация крыс при комнатной температуре (временный интервал между стимулами), ulcerогенный стимул — 6 ч иммобилизация при холоде (cold restraint, 10 °C) на фоне предварительного голодания крыс. Японские коллеги использовали эту модель для выяснения вклада ПГ и изоформ циклооксигеназы 1 и 2 в гастропротективный эффект стрессорного преко́ндиционирования [43]. В наших исследованиях эта модель использовалась для выяснения вклада глюкокортикоидных гормонов в гастропротективный эффект стрессорного преко́ндиционирования.

При изучении механизмов гастропротективного действия стрессорного преко́ндиционирования внимание исследователей преимущественно фокусировалось на роли ПГ. Это легко объяснить известным вкладом ПГ в защиту слизистой оболочки желудка со времен открытия феномена “цитопротекции в желудке” (“gastric cytoprotection”), которое сделал Андре Роберт (Andre Robert) 45 лет назад [46], и последующего открытия им феномена “адаптивной цитопротекции” (“adaptive cytoprotection”) [47]. Андре Роберт продемонстрировал, что введение крысам ПГ в дозах, которые не ингибируют секрецию соляной кислоты в желудке, предотвращает

образование геморрагических эрозий, индуцированных химическими стимулами. Свойство ПГ поддерживать целостность слизистой оболочки желудка на уровне клеток (“cellular integrity of the gastric mucosa”) и, благодаря этому, препятствовать образованию повреждений Андре Роберт назвал “цитопротекцией” [46]. Дополнительно к феномену “цитопротекции” (или “прямой цитопротекции” экзогенными ПГ) Андре Роберт описал феномен “адаптивной цитопротекции”, суть которой заключается в том, что умеренные раздражители защищают слизистую оболочку желудка от последующего повреждающего действия химических агентов за счет ПГ, высвобождающихся в ответ на умеренные раздражители [47]. При этом он опять делал акцент на поддержании целостности клеток слизистой оболочки желудка.

Феномен стрессорного прекондиционирования (а также и прекондиционирования ишемией-реперфузией) с его гастропротективным эффектом можно рассматривать как результат эволюции феномена “адаптивной цитопротекции” [40]. При этом следует подчеркнуть, что термин гастропротекция, пришедший на смену термину цитопротекция, подразумевает более комплексный в целом механизм защиты слизистой оболочки желудка, чем исходно предполагал Андре Роберт, и, кроме того, не ограничивается участием только ПГ [48]. Тем не менее, при такой эволюции от адаптивной цитопротекции к гастропротективному прекондиционированию доминантный интерес к ПГ сохранился. Выявлен важный вклад ПГ в реализацию гастропротективного эффекта стрессорного прекондиционирования [42, 43, 49].

Вопрос о вкладе глюкокортикоидных гормонов в гастропротективный эффект стрессорного прекондиционирования ранее не изучался и даже и не ставился, вероятно, по причине распространенного отношения к стрессу и продуцирующимся при этом глюкокортикоидным гормонам как факторам с негативными эффектами.

В наших исследованиях, направленных на изучение этого вопроса, вначале был подтвержден гастропротективный эффект стрессорного прекондиционирования (умеренной 30 мин иммобилизации крыс при холоде 10°C) в условиях ulcerогенной модели (6 ч иммобилизации при холоде 10°C с предварительным 18 ч голоданием крыс). Было показано, что умеренный стрессор, предъявленный в режиме прекондиционирования, вызывает уменьшение площади эрозий в желудке, индуцированных продолжительной иммобилизацией при холоде. Кроме того, было выявлено, что умеренный стрессор позитивно влияет на поддержание температуры тела крыс, которая в условиях продолжительного холодового стресса понижалась: стрессорное прекондиционирование предотвращало это понижение [44].

Как умеренный, так и ulcerогенный стрессор естественно приводили к увеличению содержания кортикостерона в крови у крыс. Для исследования вклада глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся в ответ на умеренный стрессор, в гастропротективный эффект стрессорного прекондиционирования мы сравнивали этот эффект у крыс с нормальной продукцией глюкокортикоидных гормонов в ответ на умеренный стрессорный стимул и у крыс с угнетенной продукцией этих гормонов. Для угнетения стрессорной продукции кортикостерона использовали метирапон (30 мг/кг, в/б), который вводили за 20 мин до начала действия умеренного стрессора.

Введение метирапона приводило к быстрому угнетению (но не устранению) стрессорной продукции глюкокортикоидных гормонов в ответ на умеренный прекондиционирующий стрессор и сопровождалось устранением гастропротективного эффекта этого стрессорного прекондиционирования. Более того, после введения метирапона исходно позитивный (гастропротективный) эффект стрессорного прекондиционирования трансформировался в негативный (проulcerогенный), о чем свидетельствовало резкое увеличение площади эрозий в этой ситуации по сравнению с исходной (без прекондиционирования) [44]. К устранению гастропротективного эффекта стрессорного прекондиционирования приводила также и блокада глюкокортикоидных рецепторов их специфическим антагонистом RU-38486 во время действия умеренного стрессора. Дополнительно у крыс, которым вводили метирапон или RU-38486, мы обнаружили и устранение превентивного эффекта стрессорного прекондиционирования на падение температуры тела [40, 44], что указывает на то, что один из механизмов гастропротективного действия стрессорного прекондиционирования связан с превентивным влиянием глюкокортикоидов на падение температуры тела.

Согласно полученным данным угнетение продукции глюкокортикоидных гормонов или блокада глюкокортикоидных рецепторов во время действия умеренного стрессора устраняют вызываемое этим стрессором в норме повышение устойчивости слизистой оболочки желудка к ulcerогенному действию последующего продолжительного стрессора. Полученные данные свидетельствуют о вкладе глюкокортикоидных гормонов в реализацию гастропротективного эффекта стрессорного прекондиционирования.

Анализ результатов, полученных нами при исследовании вклада глюкокортикоидных гормонов в гастропротективный эффект прекондиционирования ишемией-реперфузией, не входит в задачи настоящей статьи. Тем не менее, следует отметить, что продемонстрированный вклад глюкокортикоидных гормонов в гастропротективный эффект

стрессорного прекондиционирования хорошо согласуется с выявленным в наших работах (также и с использованием метирапона) вкладом глюкокортикоидных гормонов в гастропротективный эффект прекондиционирования ишемией-реперфузией. Согласно этим результатам, глюкокортикоидные гормоны принимают участие в обеспечении гастропротективного действия прекондиционирования как локальной ишемией-реперфузией желудка [21], так и дистантной (по отношению к желудку) ишемией-реперфузией [45]. Вместе эти факты свидетельствуют о важном вкладе глюкокортикоидных гормонов в гастропротективные эффекты умеренных прекондиционирующих воздействий.

Гастропротективный эффект КРФ: исследование вклада глюкокортикоидных гормонов путем угнетения их продукции метирапоном. Еще одним аргументом в пользу гастропротективной роли глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при активации ГГАС, мог бы служить факт, свидетельствующий о вкладе глюкокортикоидных гормонов в гастропротективный эффект КРФ.

КРФ — ключевой нейрогормон, запускающий стрессорный ответ и играющий важнейшую роль в сохранении и восстановлении гомеостаза путем стимуляции активности ГГАС. КРФ принадлежит важная роль в интеграции функционирования различных систем организма при стрессе [50]. Хорошо известно, что введение КРФ как центральное, так и периферическое приводит к быстрому повышению уровня кортикостерона в крови у крыс, сопоставимому со стресс-индуцированным повышением, что показано и в наших работах [51–53].

Около 30 лет назад несколькими группами исследователей было продемонстрировано гастропротективное действие экзогенного КРФ, преимущественно при его центральном введении [54–58]. Гастропротективное действие КРФ выявлено в классических стрессорных ulcerогенных моделях: 3–4 ч иммобилизации при холоде [55, 57, 58] и 2–4 ч иммобилизации с погружением крыс в воду [54, 56].

Сразу после открытия гастропротективного эффекта КРФ была сделана попытка оценить участие глюкокортикоидных гормонов в его реализации. Поскольку у адреналэктомированных крыс гастропротективное действие КРФ при его центральном введении сохранялось, было сделано заключение о неучастии глюкокортикоидных гормонов в КРФ-индуцированной гастропротекции [56]. Долгое время вопрос оставался открытым. Существующая догма об ulcerогенном действии глюкокортикоидных гормонов, вероятно, влияла на отсутствие интереса к его прояснению. Выявленная нами гастропротективная роль глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при стрессе, стала основанием возобновить исследование этого вопроса.

Для начала требовалось воспроизвести гастропротективный эффект экзогенного КРФ в экспериментах на крысах. Исследования начали в условиях стрессорной ulcerогенной модели (3 ч иммобилизации при холоде 10°C, на фоне предварительного голодания крыс) при периферическом (в/б) введении КРФ, которое было выбрано по причине противоречивости существующих в литературе данных о влиянии КРФ при этом способе введения. Мы обнаружили, что внутрибрюшинное введение КРФ в малых дозах (1.25 или 2.5 мкг/кг) приводит к быстрому повышению уровня кортикостерона в крови у крыс и к уменьшению площади эрозий в желудке (проявлению гастропротективного эффекта) [52, 59].

На следующем этапе оценивали вклад глюкокортикоидных гормонов, индуцированных введением КРФ (1.25 мкг/кг, в/б, за 30 мин до ulcerогенного стимула), в его гастропротективное действие. Для этого сравнивали гастропротективное влияние КРФ у крыс с нормальной продукцией глюкокортикоидных гормонов в ответ на введение КРФ и у крыс с угнетенной продукцией этих гормонов. Метирапон (30 мг/кг, в/б, за 30 мин до введения КРФ) был использован для угнетения КРФ-индуцированной продукции кортикостерона у крыс [52, 59]. Все те же преимущества метирапона, о которых мы писали в предыдущих разделах, определили наш интерес именно к этому подходу и в этом случае: кратковременный ингибирующий эффект метирапона на синтез глюкокортикоидных гормонов и умеренность в ингибировании КРФ-индуцированного повышения уровня гормонов в крови. Введение метирапона, приводящее к угнетению КРФ-индуцированного уровня кортикостерона в крови у крыс, сопровождалось устранением гастропротективного действия КРФ [52, 60, 61]. К предотвращению гастропротективного действия КРФ приводила также и блокада глюкокортикоидных рецепторов их антагонистом RU-38486 [25]. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении глюкокортикоидных гормонов в гастропротективное действие КРФ в стрессорной ulcerогенной модели.

Поскольку данные литературы ограничиваются гастропротективными эффектами КРФ в стрессорных ulcerогенных моделях, мы проверили, может ли подобный защитный эффект КРФ проявляться и в условиях ulcerогенеза, индуцированного индометацином (35 мг/кг, в/б). Полученные результаты подтвердили эту возможность. Введение КРФ (1.25 мкг/кг и 2.5 мкг/кг, в/б, за 30 мин до введения индометацина) дозозависимо увеличивало уровень кортикостерона в крови у крыс и дозозависимо уменьшало площадь эрозий, индуцированных индометацином [53]. Введение метирапона (30 мг/кг, в/б, за 30 мин до введения КРФ) приводило к угнетению КРФ-индуцированного

повышения кортикостерона и устранению гастропротективного эффекта КРФ. Устранение гастропротективного эффекта КРФ в индометациновой ulcerогенной модели происходило также при угнетении КРФ-индуцированной продукции кортикостерона селективным антагонистом КРФ-1 рецепторов NBI 27914 и при блокаде глюкокортикоидных рецепторов их специфическим антагонистом RU-38486 [53].

Полученные данные убедительно демонстрируют возможность проявления гастропротективного действия КРФ при его периферическом введении, причем не только в стрессорной модели (3 ч иммобилизации при холоде), но в индометациновой ulcerогенной модели [53], а кроме того, также и при ulcerогенном действии ишемии-реперфузии желудка [59]. Согласно полученным результатам, глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на введение КРФ (в/б), вовлекаются в реализацию его гастропротективного действия как в стрессорной, так и индометациновой ulcerогенных моделях [52, 53, 59].

Поскольку в литературе отсутствовали данные о влиянии КРФ при его центральном введении на язвообразование, индуцированное индометацином, мы решили восполнить этот пробел. В наших экспериментах КРФ вводили в боковые желудочки мозга в специально подобранной дозе 10 мкг/крысу за 30 мин до инъекции индометацина. КРФ при центральном введении (10 мкг/крысу) приводил к быстрому и существенному повышению содержания кортикостерона в крови и это сопровождалось уменьшением площади эрозивных повреждений слизистой оболочки желудка, индуцированных индометацином [62]. Для проверки участия глюкокортикоидных гормонов в выявленном гастропротективном эффекте КРФ также использовали метирапон. Предварительное введение метирапона, которое вызывало кратковременное ингибирование КРФ-индуцированной продукции кортикостерона, значительно ослабляло гастропротективное действие КРФ в индометациновой ulcerогенной модели [62]. Вместе с тем, тот факт, что метирапон лишь ослаблял, но не предотвращал совсем гастропротективное действие КРФ (при центральном введении), свидетельствует о значимом участии и других факторов в обеспечении этого защитного действия. Таким образом, гастропротективное действие КРФ при его центральном введении проявляется и в условиях ulcerогенного влияния индометацина. При этом, глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на введение КРФ, принимают участие в реализации его гастропротективного действия.

Выявленный факт, свидетельствующий о вкладе глюкокортикоидных гормонов в гастропротективный эффект экзогенного КРФ, является еще

одним аргументом в пользу гастропротективной роли глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при активации ГГАС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные исследования, проведенные на крысах с использованием метирапона, продемонстрировали, что его использование может быть адекватным и ценным подходом для оценки вклада глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при острой активации ГГАС, в гастропротекцию.

При оценке вклада глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся в ответ на умеренные, неulcerогенные в норме стрессоры или введение КРФ, в гастропротекцию, было показано, что угнетение продукции этих гормонов метирапоном приводит к: 1) трансформации неulcerогенных в норме стимулов в ulcerогенные; 2) устранению гастропротективного эффекта стрессорного прекодиционирования; 3) устранению гастропротективного эффекта КРФ.

Эффекты метирапона воспроизвелись в условиях угнетения продукции глюкокортикоидных гормонов селективным антагонистом КРФ-1 рецепторов NBI 27914 и при блокаде глюкокортикоидных рецепторов их антагонистом RU38486. Приведенные данные свидетельствуют в пользу того, что: а) глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на умеренные стрессорные стимулы, вносят вклад в защиту слизистой оболочки желудка в этих условиях, а также повышают ее устойчивость к последующим ulcerогенным воздействиям (т.е. вносят вклад в гастропротективный эффект стрессорного прекодиционирования); б) глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на введение КРФ, принимают участие в реализацию его гастропротективного действия.

Согласно полученным результатам, для устранения гастропротективного действия кортикостерона, продуцирующегося у крыс в ответ на умеренные стрессоры или введение КРФ, достаточно частичного угнетения стрессорной волны кортикостерона (угнетения около 50% нормального ответа), что было выявлено с помощью метирапона. Этот факт позволяет предположить, что для гастропротекции чрезвычайно важен полноценный естественный стрессорный гормональный ответ. Вероятно, только в этом случае происходит полноценная реализация ("развертывание") всей программы стрессорного ответа на уровне организма, что сказывается на функционировании всех его систем и отражается на повышении способности слизистой оболочки желудка противостоять ulcerогенным воздействиям. Результаты, полученные нами ранее при исследовании механизмов гастропротективного действия глюкокортикоидных

гормонов, свидетельствуют о том, что глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся при острой активации ГГКС, могут вносить вклад в поддержание целостности слизистой оболочки желудка посредством их влияния на звенья общего гомеостаза в организме. Поддерживающее влияние глюкокортикоидов на артериальное давление, уровень глюкозы в крови, температуру тела может быть основой их благотворного действия на локальные факторы слизистой оболочки желудка [63]. Это, в свою очередь, означает, что гастропротективное действие глюкокортикоидных гормонов — неотъемлемая составляющая их общего адаптационного влияния.

Полученные данные подтверждают, что активация ГГКС является гастропротективным компонентом стрессорной реакции, а глюкокортикоидные гормоны, при этом продуцирующиеся, важными гастропротективными факторами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Большая благодарность сотрудникам лаборатории экспериментальной эндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН за проведение экспериментов или участие в экспериментах, результаты которых проанализированы в настоящей обзорной статье: Багаевой Татьяне Ростиславовне, которой уже нет с нами, Мязиной Марине Александровне, Морозовой Ольге Юрьевне, Колбасовой Татьяне Ивановне.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411784-3-3.1.8).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hagen S.J. // Curr. Opin. Gastroenterol. 2024. Jun 25. Online ahead of print
2. Szabo S. // J. Gastroenterol. Hepatol. 2014. Vol. 29. Suppl 4. № S4. P. 124–132.
3. Tarnawski A., Ahluwalia A., Jones M.K. // Curr. Pharm. Des. 2013. Vol. 19. № 1. P. 126–132.
4. Wallace J.L. // Physiological Reviews. 2008. Vol. 88. № 4. P. 1547–1565.
5. Dejban P., Eslami F., Rahimi N., Takzare N., Jahansou M., Dehpour A.R. // Eur. J. Pharmacol. 2020. Vol. 887. P. 173579.
6. Mózsik G., Szolcsányi J., Dömötör A. // Inflammopharmacology. 2007. Vol. 15. № 6. P. 232–245.
7. Whittle B.J.R., Lopez-Belmonte J., Moncada S. // Br. J. Pharmacol. 1990. Vol. 99. № 3. P. 607–611.
8. Селье Г. // Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз. 1960. 254 с.
9. Whitehouse M.W. // Inflammopharmacology. 2011. Vol. 19. № 1. P. 1–19.
10. Филаретова Л.П. // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1990. Т. 76. № 11. С. 1594–1600.
11. Филаретова Л.П., Филаретов А.А. // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1992. Т. 78. № 10. С. 77–83.
12. Filaretova L.P., Filaretov A.A., Makara G.B. // Am. J. Physiol. 1998. Vol. 274. № 6. Pt. 1. P. G1024–1030.
13. Filaretova L. // Ther. Adv. Chronic Dis. 2011. Vol. 2. № 5. P. 333–342.
14. Filaretova L. // Auton. Neurosci. 2006. Vol. 125. № 1–2. P. 86–93.
15. Filaretova L., Bagaeva T. // Curr. Neuropharmacol. 2016. Vol. 1. № 8. P. 876–881.
16. Filaretova L., Podvigina T., Yarushkina N. // Curr. Pharm. Des. 2020. Vol. 26. № 25. P. 2962–2970.
17. Filaretova L. // Curr. Pharm. Des. 2013. Vol. 19. № 1. P. 29–33.
18. Filaretova L., Podvigina T., Bagaeva T., Makara G. // J. Physiol. Paris. 2001. Vol. 95. № 1–6. P. 201–208.
19. Filaretova L., Bagaeva T., Makara G.B. // Life Sci. 2002. Vol. 71. № 21. P. 2457–2468.
20. Filaretova L.P., Podvigina T.T., Bagaeva T.R., Tanaka A., Takeuchi K. // Inflammopharmacology. 2005. V. 13. P. 27–43.
21. Bobryshev P., Bagaeva T., Filaretova L. // J. Physiol. Pharmacol. 2009. Vol. 60. Suppl 7. P. 155–160.
22. Filaretova L., Tanaka A., Miyazawa T., Kato S., Takeuchi K. // Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 2002. Vol. 283. № 5. G1082–1089.
23. Filaretova L.P., Podvigina T., Bagaeva T.R., Tanaka A., Takeuchi K. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004. Vol. 1018. № 812. P. 288–292.
24. Filaretova L., Bagaeva T., Podvigina T. // Inflammopharmacology. 2002. Vol. 10. № 4–6. P. 401–412.
25. Ярушкина Н.И., Подвигина Т.Т., Морозова О.Ю., Филаретова Л.П. // Успехи физиологических наук. 2023. Т. 54. № 4. С. 57–72.
26. Filaretova L., Bobryshev P., Bagaeva T., Podvigina T., Takeuchi K. // Inflammopharmacology. 2007. Vol. 15. № 4. P. 146–153.
27. Laine L., Takeuchi K., Tarnawski A. // Gastroenterology. 2008. Vol. 135. № 1. P. 41–60.
28. van der Sluis R.J., van den Aardweg T., Sijsenaar T.J.P., Van Eck M., Hoekstra M. // Biomolecules. 2023. Vol. 13. № 9. P. 1287.

29. Rooszendaal B., Bohus B., McGaugh J.L. // *Psychoneuroendocrinology*. 1996. Vol. 21. № 8. P. 681–693.
30. Castinetti F. // *Arch. Med. Res.* 2023. Vol. 54. № 8. P. 102908.
31. Roberto G., Aloini M.E., Biondo I., Ricci F., Maggio R., Lardo P., Stigliano A. // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. 2024. Vol. 24.
32. Hasan Z.W., Nguyen V.T., Ashley N.T. // *PeerJ*. 2024. Vol. 12. № 6.
33. Mikics É., Kruk M.R., Haller J. // *Psychoneuroendocrinology*. 2004. Vol. 29. № 5. P. 618–635.
34. Shishkina G.T., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Lashakov D.A., Babluk E.V., Dygalo N.N. // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. № 12. P. e0143978.
35. Pegueros-Maldonado R., Pech-Pool S.M., Blancas J.J., Prado-Alcalá R.A., Arámburo C., Luna M., Quirarte G.L. // *Front. Behav. Neurosci.* 2024. Vol. 18. P. 1341883.
36. Murison R., Overmier J.B., Hellhammer D.H., Carmona M. // *Psychoneuroendocrinology*. 1989. Vol. 14. № 5. P. 331–338.
37. Filaretova L., Myazina M., Bagaeva T. // *Ideggyogy. Sz.* 2016. Vol. 69. № 9–10. P. 313–317.
38. Filaretova L., Bagaeva T., Podvigina T., Makara G. // *J. Physiol. Paris*. 2001. Vol. 95. № 1–6. P. 59–65.
39. Shishkina G.T., Bulygina V.V., Dygalo N.N. // *Psychopharmacology (Berl)*. 2015. Vol. 232. № 5. P. 851–860.
40. Filaretova L. // *Curr. Pharm. Des.* 2017. Vol. 23. № 27. P. 3923–3927.
41. Wallace J.L., Track N.S., Cohen M.M. // *Gastroenterology*. 1983. Vol. 85. № 2. P. 370–375.
42. Brzozowski T., Konturek P.C., Konturek S.J., Drozdowicz D., Pajdo R., Pawlik M., Brzozowska I., Hahn E.G. // *J. Physiol. Paris*. 2000. Vol. 94. № 2. P. 83–91.
43. Tanaka A., Hatazawa R., Takahira Y., Izumi N., Filaretova L., Takeuchi K. // *Dig. Dis. Sci.* 2007. Vol. 52. № 2. P. 478–487.
44. Filaretova L.P., Bagaeva T.R., Amagase K., Takeuchi K. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. Vol. 1148. P. 209–212.
45. Filaretova L., Komkova O., Sudalina M., Yarushkina N. // *Front. Pharmacol.* 2021. Vol. 12. P. 682643.
46. Robert A., Nezamis J.E., Lancaster C., Hanchar A.J. // *Gastroenterology*. 1979. Vol. 77. № 3. P. 433–443.
47. Robert A., Nezamis J.E., Lancaster C., Davis J.P., Field S.O., Hanchar A.J. // *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 1983. Vol. 8. № 1. P. G113–121.
48. Szabó S. // *Acta Physiol. Hung.* 1989. Vol. 73. № 2–3. P. 115–127.
49. Wallace J.L., Cohen M.M. // *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 1984. Vol. 247. № 2. Pt. 1. P. G127–132.
50. Stengel A., Taché Y. // *Exp. Biol. Med.* 2010. Vol. 235. № 10. P. 1168–1178.
51. Мязина М.А., Багаева Т.Р., Филаретова Л.П. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2014. Т. 100. № 12. С. 1421–1430.
52. Filaretova L., Bagaeva T., Morozova O. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2012. Vol. 32. № 5. P. 829–836.
53. Filaretova L.P., Morozova O.Y., Yarushkina N.I. // *J. Physiol. Pharmacol.* 2021. Vol. 72. № 5. P. 1–10.
54. Bakke H.K., Bogsnes A., Murison R. // *Physiol. Behav.* 1990. Vol. 47. № 6. P. 1253–1260.
55. Ray A., Henke P.G., Gulati K., Sen P. // *Brain Res.* 1993. Vol. 624. № 1–2. P. 286–290.
56. Shibasaki T., Yamauchi N., Hotta M., Masuda A., Oono H., Wakabayashi I., Ling N., Demura H. // *Life Sci.* 1990. Vol. 47. № 11. P. 925–932.
57. Wang L., Cardin S., Martinez V., Tache Y. // *Brain Res.* 1996. Vol. 736. № 1–2. P. 44–53.
58. Gunion M.W., Kauffman G.L., Tache Y. // *Am. J. Physiol.* 1990. Vol. 258. № 1. Pt. 1.
59. Филаретова Л.П., Багаева Т.Р., Морозова О.Ю. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2012. Т. 98. № 12. С. 1555–1566.
60. Filaretova L.P. // *Neurochemical Journal*. 2018. Vol. 12. № 2. P. 127–129.
61. Filaretova L.P., Morozova O.Yu. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022. Vol. 58. № 6. P. 1994–2006.
62. Мязина М.А., Багаева Т.Р., Филаретова Л.П. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2014. Т. 100. № 12. С. 1421–1430.
63. Filaretova L.P., Podvigina T.T., Bobryshev P.Yu., Bagaeva T.R., Tanaka A., Takeuchi K. // *Inflammopharmacology*. 2006. Vol. 14. № 5–6. P. 207–213.

Inhibition of Glucocorticoid Synthesis by Metyrapone as an Approach to Study Their Contribution to Gastroprotection in Rats

L. P. Filaretova¹

¹Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

According to the results of our research glucocorticoids produced in response to stress ulcerogenic stimuli are gastroprotective factors. The aim of this review article is to demonstrate, through the analysis of data obtained in our studies, that the inhibition of glucocorticoid synthesis by metyrapone can be an adequate and valuable approach for studying the contribution of glucocorticoids, produced during acute activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, to gastroprotection in rats. When studying the contribution of glucocorticoids produced in response to moderate, normally non-ulcerogenic stressors or to the administration of the corticotropin-releasing factor (CRF) to gastroprotection, it was shown that the suppression of these hormones by metyrapone leads to: 1) the transformation of normally non-ulcerogenic stimuli into ulcerogenic ones; 2) the elimination of the gastroprotective effect of stress preconditioning; 3) the elimination of the gastroprotective effect of CRF. The effects of metyrapone were reproduced under conditions of suppressed glucocorticoid production using the selective CRF-1 receptor antagonist NBI 27914 and the blockade of glucocorticoid receptors with their antagonist RU38486. The data presented suggest that: a) glucocorticoids produced in response to moderate stress stimuli contribute to the protection of the gastric mucosa under these conditions and increase its resistance to subsequent ulcerogenic stimuli (i.e., they contribute to the gastroprotective effect of stress preconditioning); b) glucocorticoids produced in response to CRF administration participate in the realization of its gastroprotective action. The data obtained confirm that the activation of the HPA axis is a gastroprotective component of stress response, and stress-produced glucocorticoids are important gastroprotective factors.

Keywords: gastroprotection, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, glucocorticoids, indomethacin, corticotropin-releasing factor, rats, metyrapone, stress, stress preconditioning, gastric erosions

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ СТРИАТУМСПЕЦИФИЧНОЙ ПРОТЕИНТИРОЗИНФОСФАТАЗЫ STEP В РЕГУЛЯЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ

© 2024 г. В. С. Москалюк¹, *, А. В. Куликов¹, В. С. Науменко¹, Е. А. Куликова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: v.moskaliuk@alumni.nsu.ru

Поступила в редакцию 30.06.2024 г.

После доработки 01.08.2024 г.

Принята к публикации 10.08.2024 г.

Стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза (STEP) — это внутриклеточный белок, который участвует в ключевых сигнальных каскадах нервной клетки. Регулируя локализацию на мембране глутаматных рецепторов и активность ряда сигнальных киназ, STEP влияет на процессы нейропластичности и работы синапсов, участвует в регуляции поведения, когнитивных функций и памяти. STEP может выступать посредником между нейротрофической, дофамин- и глутаматергическими системами мозга. Нарушения экспрессии и работы этого белка наблюдаются в ряде нейродегенеративных и психических заболеваний, а также при старении и черепно-мозговых травмах. При болезнях Альцгеймера и Паркинсона, а также синдроме ломкой X-хромосомы наблюдается повышение активности и экспрессии STEP в мозге пациентов и в моделях этих заболеваний на животных. Существуют данные об участии этой фосфатазы в механизмах депрессии, расстройств аутистического спектра, шизофрении и тревожности, однако разные модельные объекты и условия экспериментов дают противоречивые результаты. STEP играет модулирующую роль в ответе нервной системы на травмы мозга, ишемический инсульт, эпилептические припадки и стрессовое воздействие. В связи с участием STEP в патогенезе множества заболеваний нервной системы, эта фосфатаза активно изучается на протяжении последнего десятилетия. В этой обзорной работе мы подробно рассмотрели имеющиеся данные о роли STEP в ЦНС, в механизмах развития заболеваний и в реакции нервных клеток на повреждающие воздействия.

Ключевые слова: стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза STEP, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, синдром ломкой X-хромосомы, депрессия, тревожность, агрессия, шизофрения, аутизм, эпилепсия, ишемия, старение, стресс, черепно-мозговые травмы

DOI: 10.31857/S1027813324040042, EDN: ENGKMT

Список использованных сокращений

Aβ — Амилоид бета
AMPA — Рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
BDNF — Нейротрофический фактор мозга
CREB — Транскрипционный фактор cAMP response element-binding protein
D2R — Рецептор дофамина 2-го типа
DARPP-32 — Фосфатаза, регулируемая дофамином и цАМФ
ERK — Киназа, регулируемая внеклеточным сигналом
FMRP — Белок Fragile X mental retardation protein

Fyn — Нерцепторная тирозинкиназа src-семейства
GluA2 — Субъединица AMPA рецептора
GluN2B — Субъединица NMDA рецептора
HTT — Белок хантингтин
МАРК — Семейство активируемых митогеном протеинкиназ
mGluR — Метаботропный рецептор глутамата
nAChR — Никотиновый рецептор ацетилхолина
NMDA — Рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат
p38 — Киназа из семейства MAP-киназ
PKA — Протеинкиназа А
PP1 — Протеинфосфатаза 1

PP2B – Протеинфосфатаза 2B, кальциневрин

Ptpn5 – Ген, кодирующий фосфатазу STEP

Ryk2 – Богатая пролином тирозинкиназа 2

shPHK – Малые РНК, образующие шпильки

SPIN90 – Фактор, регулирующий полимеризацию актина

STEP – Стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза

ТС-2153 – 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин

TrkB – Тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор типа В

ВВЕДЕНИЕ

В 1991 году Paul Lombroso с коллегами впервые обнаружили мРНК гена *Ptpn5*, кодирующего фосфатазу STEP в мозге крыс [1]. Ее наибольшее количество определялось в стриатуме, поэтому новый открытый фермент был назван STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase – STEP (перевод на русский – стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза [2]). Несмотря на русскоязычное название, которое подразумевает наличие этого белка исключительно в стриатуме, фосфатаза STEP также широко экспрессируется в других отделах ЦНС [1]. Она присутствует в клетке в нескольких изоформах, каталитически активными



Рис. 1. Механизмы регуляции и субстраты STEP. STEP дефосфорилирует субъединицы GluN2B и GluA2 NMDA и AMPA рецепторов соответственно, что влечет за собой их инактивацию и интернализацию. Дефосфорилирование киназ Fyn, Ryk2, ERK1/2 и p38 приводит к ингибированию их активности и деактивации последующих сигнальных путей. Дефосфорилирование SPIN90 вызывает высвобождение кофилина, который деполимеризует актин. STEP активируется дефосфорилированием, которое регулируется каскадом PP2B/DARPP-32/PP1. Обратный процесс катализируется протеинкиназой А (PKA). Разрушается STEP убиквитин-протеасомной системой или расщепляется протеазой кальпаином с образованием неактивной изоформы STEP33, которая может связываться с другими изоформами STEP и тем самым деактивировать их. Активация рецептора BDNF – TrkB приводит к деградации STEP через убиквитин-протеасомную систему.

и наиболее распространенными являются STEP61 и STEP46 [3, 4]. Они различаются наличием двух трансмембранных доменов, позволяющих изоформе STEP61 прикрепляться к мембране, а также наличием у нее двух участков специфического связывания с субстратами [5]. На клеточном уровне STEP обнаруживается в соме и отростках нейрона, но отсутствует в ядре [6]. STEP в основном находится на внутренней стороне плазматической мембраны, на микротрубочках в дендритах и в постсинаптическом уплотнении [6], кроме того STEP61 также присутствует на мембране ЭПР [5].

STEP является тирозиновой протеинфосфатазой, которая регулирует активность своих субстратов, дефосфорилируя их по тирозиновому аминокислотному остатку. В настоящее время было показано взаимодействие STEP с протеинкиназами ERK1/2, p38, Fyn и Pyk2 [7–10], белком SPIN90 [11], а также субъединицами глутаматных рецепторов NMDA и AMPA [12, 13] (рис. 1). За счет этого STEP участвует в регуляции нейропластичности, процессов пролиферации и миграции нейронов, работы синапсов, долговременной потенциации и долговременной депрессии, а также является посредником в процессах цитотоксичности и клеточной гибели. Активность STEP регулируется фосфорилированием [14, 15], димеризацией между изоформами [16], убиквитин-протеасомной системой [17] (рис. 1). STEP тесно взаимосвязана с дофамин- и глутаматергическими медиаторными системами мозга [12–14, 17] и нейротрофическим фактором BDNF [18–20].

Изменения в экспрессии и активности STEP были обнаружены в ряде нейропатологий, таких как болезни Альцгеймера [21], Паркинсона [22], Хантингтона [23], синдром ломкой X-хромосомы [24], шизофрении [25], расстройства аутистического спектра [26]. STEP выступает одним из регуляторов выживания нейронов при ишемии, эпилепсии, черепно-мозговых травмах и стрессе. Последние два десятилетия STEP активно изучается в моделях многих нейропатологий. Свою эффективность в борьбе с симптомами этих заболеваний показал как нокаут гена, кодирующего STEP, так и ингибирование этой фосфатазы с помощью синтезированного в Институте органической химии в Новосибирске бензопентатиепина ТС-2153 [21, 27–31]. Потенциальная возможность применения этих методов в медицинской практике стимулирует современные исследования STEP и поиск новых возможностей влияния на ее активность и экспрессию [32–35]. Однако в русскоязычной литературе уделяется мало внимания этой теме, а современные зарубежные обзоры концентрируются на одном заболевании (например, болезнь Альцгеймера [36]) или группе нейропатологий [37]. В этой обзорной статье мы постараемся заполнить этот пробел: охватить полный список

современных патологий, а также физиологических процессов, в которых было показано участие белка STEP, и осветить, в том числе, результаты исследований последних лет.

STEP В НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ И СОПУТСТВУЮЩИХ ИМ СОСТОЯНИЯХ ЦНС

В ряде патологических и нормальных состояний нервной системы, связанных с нейродегенеративными процессами, наблюдается повышенная активность или экспрессия STEP как в мозге пациентов, так и в моделях на лабораторных животных. Так, повышенный уровень STEP характерен для болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), синдрома ломкой X-хромосомы, а также ассоциирован с агрессивным поведением и старением. В то же время при болезни Хантингтона наблюдается сниженная экспрессия STEP.

Болезнь Альцгеймера — наиболее распространенный тип деменции, характеризующийся нарушениями памяти, восприятия и когнитивных функций. В мозге пациентов с БА наблюдается накопление амилоида бета (A β), и считается, что это служит основной причиной характерных когнитивных симптомов [38]. Повышенный уровень STEP был обнаружен в префронтальной коре пациентов с БА [12] и характерен для моделей этого заболевания на мышах линий Tg2576 [12], J20 [39], APP/PS1 [40] и 3xTg-AD [41]. Накопление STEP в мозге сопровождалось дефосфорилированием субъединиц NMDA и AMPA рецепторов и снижением экспрессии этих рецепторов на синаптической мембране [12, 42] и повышало уровень фосфорилирования ERK и CREB [40, 41], что позволяет предположить центральную роль STEP в этих процессах. Патологическое накопление STEP может быть результатом вызванных A β нарушений убиквитин-протеасомной системы. В поддержку этой теории говорит то, что блокировка этой системы в клетках дикого типа также приводит к повышению уровня STEP [12], а на срезах коры головного мозга 12-месячных мышей линии Tg2576 наблюдается большее количество конъюгатов STEP-убиквитин [12]. Lin Zhang с коллегами предложили еще один возможный механизм поддержания повышенной активности STEP при БА [40]. Известно, что A β способен активировать α 7-никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) [43], что вызывает ток кальция внутрь нейрона, активацию кальциневрина и фосфатазы PP2B, которая дефосфорилирует и активирует STEP [15]. Применение антагониста α 7-nAChR рецепторов предотвращало вызванное A β повышение активности STEP [40]. Как нокаут STEP, так и ее ингибирование с помощью вещества ТС-2153 улучшали показатели экспериментальных животных в тестах на память

и когнитивные способности [21, 41, 44, 45]. В дополнение к этому, введение ТС-2153 положительно влияло на архитектуру дендритных шипиков и синаптические связи [44]. Более подробно роль STEP в развитии БА описана в посвященной этой теме обзорной работе [36].

Болезнь Паркинсона — это нейродегенеративное заболевание, симптомами которого являются выраженные двигательные и когнитивные нарушения. Основной причиной возникновения и развития БП считается гибель дофаминовых нейронов в черной субстанции и базальных ядрах. В этих структурах обнаруживается большое количество STEP. В посмертных исследованиях тканей мозга пациентов со спорадической формой БП было обнаружено существенное повышение уровня белка STEP61 в стриатуме, а также снижение уровня фосфорилирования ее субстрата ERK [22]. Распространенной моделью изучения БП на животных является введение 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР), который вызывает двигательные и патофизиологические симптомы, схожие с наблюдаемыми у пациентов. На этой модели было показано повышение уровня белка STEP61, накопление ее дефосфорилированной активной формы, а также снижение уровня фосфорилирования ее субстратов в стриатуме и клеточных культурах [22]. Так как одним из путей деактивации и деградации STEP является ее разрушение убиквитин-протеасомной системой, была выдвинута гипотеза, что нарушение работы Е3 лигазы PARKIN (присоединяет убиквитин к белку-мишени), характерное для БП, может служить причиной повышенного уровня STEP. Авторы работы показали, что STEP может связываться с PARKIN, а повышение концентрации этой лигазы в клеточных культурах вызывает дозозависимое снижение уровня STEP, которое зависит от работы протеасом [22]. В то же время наличие мутантных форм PARKIN или снижение ее экспрессии с помощью shРНК или нокаута, наоборот, повышает уровень STEP [22]. Все это говорит о том, что PARKIN регулирует деградацию STEP в протеасомной системе, а нарушение работы этой лигазы при БП, вероятно, приводит к повышению уровня STEP.

Синдром ломкой X-хромосомы — наиболее распространенная форма умственной отсталости разной степени, сопровождающаяся нарушением концентрации внимания и речевого развития. Причиной этого заболевания является удлинение повторяющихся последовательностей CGG в гене *FMR1*, кодирующем белок FMRP, что приводит к нарушению транскрипции и трансляции этого белка. Функцией FMRP является связывание мРНК в синаптических окончаниях и регуляция локальной трансляции в дендритах. FMRP способен связываться с мРНК множества генов, в том числе с *PTPN5* [46]. На данный момент отсутствуют

данные об уровне STEP в мозге больных синдромом ломкой X-хромосомы, но у мышей с нокаутом гена *Fmr1* был зарегистрирован повышенный уровень STEP [24]. Нокаут STEP у этих мышей приводил в норму характерные для них нарушения социального и тревожного поведения [24]. Интересно, что для этой модели описана сниженная тревожность, а нокаут гена *Ptpn5* оказывал у этих животных анксиогенный эффект. Введение ТС-2153 также корректировало поведение мышей с нокаутом *Fmr1*: улучшало показатели в тестах на социальное поведение и повышало показатели тревожности до уровня контрольных животных [47]. Более того, ТС-2153 восстанавливал синаптические нарушения как в клеточных культурах, так и *in vivo*, а также противодействовал mGluR-зависимой долговременной депрессии в срезах мозга этих мышей [47]. Таким образом, в описанных заболеваниях STEP, вероятно, выполняет функцию посредника развития нейродегенеративных процессов и поведенческих и когнитивных нарушений.

Отличная от этой роль STEP наблюдается в патогенезе **болезни Хантингтона (БХ)** — генетическом нейродегенеративном заболевании, вызываемом многократной дупликацией CAG повтора в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин. Это приводит к трансляции нефункциональной формы этого белка и моторным и когнитивным нарушениям, ассоциированным с кортикостриальной и гиппокампальной системами. Существенно страдают проекционные нейроны стриатума, которые широко экспрессируют STEP. Изменения в экспрессии и активности STEP наблюдаются как у пациентов с БХ, так и на модельных линиях мышей, однако, в отличие от других нейродегенеративных заболеваний, тут экспрессия STEP снижается [23]. Так, посмертные исследования обнаружили снижение уровня мРНК гена *PTPN5* в стриатуме пациентов, а введение мышам мутантного хантингтина снижало уровень белка STEP в коре и стриатуме и повышало уровень ее фосфорилирования (а значит деактивации) в коре, стриатуме и гиппокампе [23]. При этом наблюдался повышенный уровень фосфорилирования субстратов STEP — киназ ERK и p38. Известно, что активация STEP, вызванная сверхвозбуждением клетки, приводит к клеточной гибели. Возможно, в этой модели БХ сниженный уровень активности и экспрессии STEP выступает в роли нейропротективного механизма в ответ на патологические изменения, вызванные болезнью. Действительно, при инъекции белка STEP в стриатум мышей наблюдалась повышенная гибель нейронов от цитотоксичности, вызванной агонистом NMDA рецепторов [23]. В то же время выключение мутантного хантингтина восстанавливает нормальный уровень STEP [23]. Еще одна модель БХ — мыши линии YAC128 — характеризуются сниженной чувствительностью к эксайтотоксичности,

сниженной экспрессией STEP и активированными ERK/MAPK путями [48]. Нокаут гена *Ptpn5* или ингибирование STEP веществом TC-2153 у мышей в модели БХ приводит к частичному улучшению двигательных и когнитивных симптомов [29], что говорит в пользу гипотезы о том, что снижение экспрессии и активности STEP в этом заболевании является не причиной нейродегенеративных процессов, а скорее следствием неправильной работы мутантного хантинтина и/или компенсаторного ответа клетки.

Повышение уровня STEP также наблюдается при **старении**, которое часто характеризуется нейродегенеративными процессами и когнитивными нарушениями, схожими с симптомами описанных выше заболеваний. При естественном старении мыши возрастом 18–24 месяцев имели повышенный уровень мРНК гена *Ptpn5* [49] и уровень белка STEP [27] в гиппокампе и показывали худшие результаты по сравнению с молодыми самцами в тестах на пространственную память [27]. Накопление STEP с возрастом связывают с дисфункцией убиквитин-протеасомной системы. При этом наблюдается сниженный уровень фосфорилирования субстратов STEP — GluN2B и ERK — с последующей их инактивацией, а также интернализацией NMDA рецепторов и снижением уровня BDNF [27, 49]. Мыши с нокаутом STEP в 24-месячном возрасте показывали схожие с молодыми мышами (6 месяцев) результаты в тестах водный лабиринт Морриса и Y-образный лабиринт. А ингибирование STEP с помощью TC-2153 у крыс улучшало результаты выполнения заданий на память в T-образном лабиринте при старении [27]. В то же время в модели здорового старения у крыс LOU/C/Jal с возрастом наблюдаются стабильные уровни STEP и фосфорилирования ее субстратов [27], а в модели ускоренного старения — у крыс линии OXYS — уже в возрасте 20 дней наблюдался повышенный уровень белка STEP в сетчатке по сравнению с крысами Wistar [50].

Одним из патологических поведенческих паттернов, нередко сопровождающих нейродегенеративные заболевания, является **агрессия** [51–54]. Агрессия представляет собой сложную форму поведения, направленную на принесение вреда другой особи, неоднородную в своих причинах и целях, затрагивающую множество регуляторных систем мозга. В настоящее время существует всего несколько работ, в которых исследовалась роль белка STEP в различных моделях этого поведения. Так, в модели защитно-оборонительной агрессии у агрессивных и ручных крыс, селекционированных на агрессивное поведение по отношению к человеку и его отсутствие, были обнаружены существенные различия в уровне данного белка. Агрессивные крысы характеризовались резким увеличением уровня STEP, а введение TC-2153

оказывало выраженный антиагрессивный эффект на этих животных как в остром, так и в хроническом введении и снижало уровень STEP46 при остром введении [55].

В то же время при исследовании межсамцовой агрессии в тесте “резидент-интродер” мыши с нокаутом гена *Ptpn5* не отличались от мышей дикого типа по проявлению агрессии, хотя характеризовались повышенным доминантным поведением, выражающимся в прижимании интродера к полу клетки [56]. В более поздних исследованиях у этой линии нокаутов было зарегистрировано, напротив, более субмиссивное поведение в тесте “труба” при взаимодействии с противниками дикого типа [57]. Однако этот тест, в отличие от теста “резидент-интродер”, проводится на нейтральной территории и агрессивное поведение как таковое здесь не фиксировалось, а доминирование определялось как способность вытеснить противника из трубы. Таким образом участие белка STEP в механизмах агрессии, вероятно, в значительной степени зависит от типа агрессии и модели животных.

Описанные в этом разделе исследования показали изменения в уровне и активности STEP при нейродегенеративных заболеваниях и связанных с нейродегенеративными процессами состояниях нервной системы (рис. 2). В большинстве случаев наблюдается повышение уровня этого белка. Чаще всего причиной этого выступает дисфункция убиквитин-протеасомной системы и неспособность клетки разрушать STEP. Способность этой фосфатазы деактивировать ключевые элементы процессов нейропластичности, синаптической потенциации и выживания нервных клеток позволяет предположить, что повышение уровня STEP может служить одной из причин наблюдаемых нейродегенеративных процессов и когнитивных нарушений.

STEP В ПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Исследования участия STEP в механизмах таких психических расстройств, как депрессия, тревожное расстройство, шизофрения и расстройства аутистического спектра (РАС) дают противоречивые результаты и не позволяют однозначно сказать о роли этой фосфатазы в их механизмах. В зависимости от структуры мозга и выбранной модели наблюдаются разнонаправленные изменения в активности и экспрессии STEP при данных патологиях.

Депрессия, или депрессивное расстройство, является распространенным нарушением психического здоровья, которое характеризуется длительными периодами подавленного настроения, утратой интереса к привычной деятельности и неспособностью получать от нее удовольствие. Ранее было предположено участие фосфатазы STEP в механизмах депрессии [58, 59]. В пока единственном исследовании посмертных образцов мозга

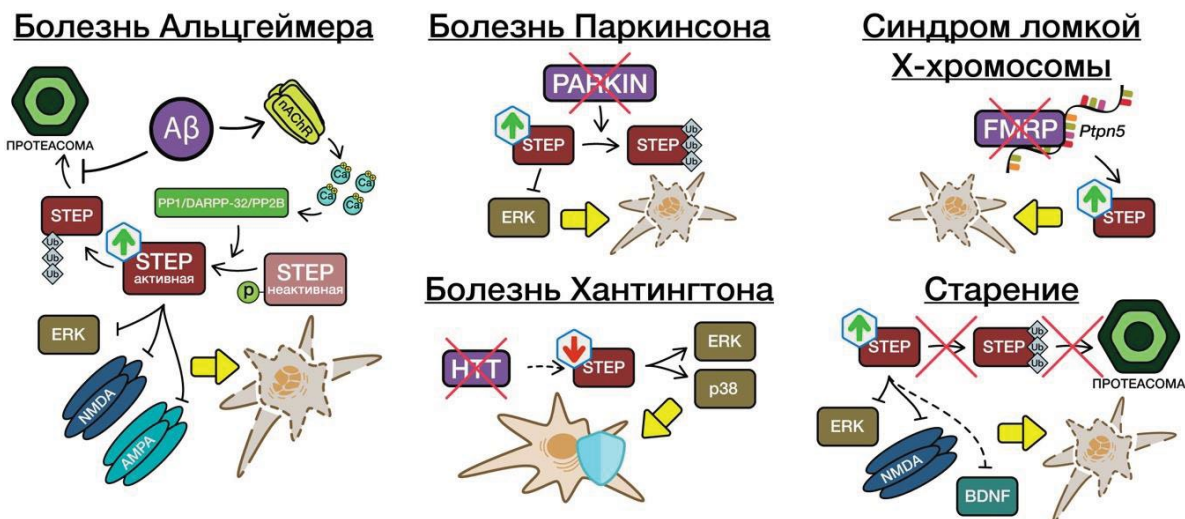


Рис. 2. Механизмы участия STEP в нейродегенеративных процессах. При болезни Альцгеймера амилоид бета ($A\beta$) нарушает работу убиквитин-протеасомной системы, а также может активировать $\alpha 7$ никотиновые рецепторы ацетилхолина, что приводит к внутриклеточному току кальция, активации сигнального каскада фосфатаз PP2B/DARPP-32/PP1, который регулирует активность STEP. Деактивация субстратов STEP киназы ERK и глутаматных рецепторов NMDA и AMPA приводит к развитию нейродегенеративных процессов. Для болезни Паркинсона характерны нарушения в работе E3-лигазы PARKIN, которые приводят к накоплению STEP. При синдроме ломкой X-хромосомы отсутствие белка FMRP, который в норме связывает мРНК гена *Ptprn5*, вызывает повышенный уровень локальной трансляции STEP. При болезни Хантингтона наблюдается снижение уровня STEP в следствие неправильной работы мутантного белка хантингтина (HTT) и/или компенсаторных процессов, что имеет нейропротекторный эффект. При старении также наблюдается повышенный уровень STEP, что связывают с дисфункцией убиквитин-протеасомной системы.

пациентов с депрессивным расстройством не было выявлено отличий от контрольной группы в уровнях белка STEP и мРНК гена, ее кодирующего [60]. Однако результаты, указывающие на участие STEP в механизмах данной патологии, были получены на животных. Так, у мышей с нокаутом STEP наблюдалось увеличение времени замирания в тесте “принудительного плавания”, что указывает на депрессивно-подобное поведение [57]. Более того, при нокдауне гена *Ptprn5* во фронтальной коре у крыс также наблюдалось депрессивно-подобное поведение, которое корректировалось кетаминном — антагонистом NMDA рецепторов, обладающим антидепрессантным эффектом [61]. В одной из моделей депрессии — при непредсказуемом хроническом стрессе — у крыс было обнаружено снижение экспрессии STEP61 на участках мембраны, не относящихся к синапсам, с сопутствующим повышением фосфорилирования GluN2B субъединицы NMDA рецепторов [61]. В то же время в синаптических окончаниях были получены противоположные результаты: непредсказуемый хронический стресс повышал уровень STEP61 и снижал фосфорилирование GluN2B. Кетамин приводил в норму эти показатели как в синапсах, так и вне их [61]. Таким образом, полученные результаты указывают на сложную и неоднозначную роль

STEP в механизмах депрессии, зависящую от места локализации фосфатазы в клетке.

На связь STEP с депрессивным расстройством также указывают эффекты классических антидепрессантов. Острое введение имипрамина и циталопрама рыбам *Danio rerio* повышало активность STEP *in vitro* [62]. Возможно, что наблюдаемое повышение активности STEP выступает одним из факторов негативного влияния этих препаратов при остром введении. В то же время ингибитор моноаминоксидазы паргалин, который обладает антидепрессантным эффектом, снижал экспрессию гена *Ptprn5* в стриатуме мышей [2] и активность STEP в мозге рыб *Danio rerio* [63]. Интересно, что ингибитор STEP TC-2153 оказывал выраженный антидепрессантный эффект как при остром [64], так и при хроническом введении [65]. Более того, введение TC-2153 не вызывало распространенных для антидепрессантов побочных эффектов, таких как седативное действие [64], повышение тревожного и обсессивно-компульсивного поведения [65]. Действие антидепрессантов на активность и экспрессию STEP и антидепрессантное действие ингибитора STEP указывают на положительную корреляцию между этой фосфатазой и выраженностью депрессивных состояний. В то же время эксперименты с нокаутом и нокдауном STEP показывают обратную зависимость. Возможно, здесь вступают

в действие компенсаторные процессы, вызванные отсутствием этого белка, который играет модулирующую роль в процессах нейропластичности и во взаимодействии медиаторных систем друг с другом.

Депрессию и ряд других заболеваний часто сопровождает **тревожное расстройство** — группа психических расстройств, характеризующихся выраженной беспричинной тревогой или страхом. На данный момент имеется мало данных о роли STEP в этих заболеваниях. Ингибитор STEP TC-2153 оказывал анксиолитический эффект на мышей [31], рыб [66, 67] и крыс [55]. В то же время нокаут гена *Ptpn5* не приводил к изменениям в тревожном поведении у мышей дикого типа [24, 57, 68], но повышал тревожность у мышей с нокаутом гена *Fmr1* (модели синдрома ломкой X-хромосомы) [24]. Эти мыши характеризуются сниженной тревожностью по сравнению с мышами дикого типа, и нокаут STEP приводил этот показатель в норму.

Шизофрения — тяжелое психическое расстройство, которое характеризуется значительными нарушениями в восприятии реальности и когнитивными отклонениями, затрагивающими память, внимание и навыки решения задач. Согласно современным теориям в патогенезе шизофрении значительное участие принимают глутамат- и дофаминергические медиаторные системы мозга. Известна существенная роль STEP в регуляции работы глутаматных рецепторов (обзор см. в [69]). Посмертные исследования тканей мозга пациентов показали изменения уровня мРНК гена *PTPN5* и белка STEP, однако эти данные противоречивы. Так, повышенный уровень STEP61 наблюдался в образцах передней поясной и дорсолатеральной префронтальной коры больных шизофренией [25], в то время как в других работах не было обнаружено отличий от контрольной группы в той же дорсолатеральной префронтальной коре, а также в стриатуме [60] и мозжечке [70]. Более того, во фронтальной коре пациентов наблюдалось снижение экспрессии STEP61 и STEP33 [70]. Эти различия могут объясняться неравномерным распределением STEP в разных структурах мозга [1] или влиянием на экспрессию STEP таких факторов, как время, прошедшее с момента смерти до исследования, пол пациента [60] и прием лекарственных препаратов [70].

Для изучения шизофрении на животных широко используются антагонисты NMDA рецепторов МК-801 и фенилциклидин (PCP), введение которых вызывает поведенческие симптомы, схожие с наблюдаемыми у пациентов. Повышенный уровень STEP61 наблюдается после применения этих веществ как у мышей [20, 25], так и в клеточных культурах [20]. Большое количество STEP61 также характерно и для генетических моделей шизофрении — мышей с нокаутом гена *Nrg* и мышей линии ErbB2/4, а также для клеточных культур, полученных из тканей мозга пациентов [71]. Авторы

этих работ предполагают, что такие изменения вызваны нарушением в убиквитин-протеасомной системе, которая в норме ответственна за разрушение STEP. В то же время введение мышам антипсихотиков снижает уровень STEP и восстанавливает экспрессию глутаматных рецепторов [25]. Нокаут гена *Ptpn5* или введение TC-2153 снимают двигательные и когнитивные симптомы и восстанавливают уровень BDNF после хронического введения PCP [20, 25]. С другой стороны, введение мышам с нокаутом STEP вещества МК-801, наоборот, имеет более сильный эффект, чем у мышей дикого типа, что может объясняться разной фармакокинетикой МК-801 и PCP [68]. Также интересно, что мыши с нокаутом STEP характеризуются дефицитом преимпульсного ингибирования в стартл-тесте [68] — характерным когнитивным симптомом шизофрении.

Расстройства аутистического спектра (РАС) — это комплекс психических заболеваний, характеризующихся нарушениями социального поведения, коммуникативных способностей, а также стереотипным поведением и, в некоторых случаях, умственной отсталостью. Исследования показали, что нарушения синаптической пластичности и межнейронных связей на ранних стадиях развития являются факторами риска развития РАС. У пациентов с РАС был обнаружен повышенный уровень STEP46 в префронтальной коре, и недостаток STEP61 и STEP33 в черве мозжечка [26]. Распространенной моделью изучения РАС на животных является введение вальпроевой кислоты (ВПК) на пренатальной стадии развития. В этой модели у мышей наблюдается повышенный уровень STEP во фронтальной коре [28]. ВПК является известным эпигенетическим модулятором и, возможно, регулирует таким образом экспрессию STEP на уровне транскрипции. Возможен также путь через воздействие на BDNF, недостаток которого наблюдается после введения ВПК [72]. Известно, что BDNF вызывает снижение экспрессии STEP через убиквитин-протеасомную систему [20, 73], а недостаток BDNF, таким образом, приводит к повышению уровня STEP. В то же время ингибитор STEP в модели ВПК восстанавливал нормальное социальное поведение, а также снижал тревожность и стереотипию [28].

Таким образом, участие STEP в перечисленных расстройствах не вызывает сомнений, но понимание точных механизмов требует дальнейших детальных исследований (рис. 3).

НЕЙРОПРОТЕКТИВНАЯ И МОДУЛИРУЮЩАЯ РОЛЬ STEP

Способность STEP регулировать сигнальные пути как выживания нейронов, так и апоптоза, а также экспрессию глутаматных рецепторов на

	Экспрессия STEP			Эффект на поведение	
	Пациенты	Животные	Ответ на препараты	Нокаут	Ингибитор
Депрессия					
Тревожность				¹	
Аутизм					
Шизофрения				²	

Повышенная экспрессия STEP по сравнению с контролем

Сниженная экспрессия STEP по сравнению с контролем

Экспрессия STEP не отличается от контрольной группы

Положительное влияние на поведение

Отрицательное влияние на поведение

Отсутствие влияния на поведение

Рис. 3. STEP в психических заболеваниях. Для приведенных психических расстройств имеются неоднозначные данные относительно участия STEP. Изменения в экспрессии STEP зависят от модели исследования и структуры мозга. ¹Нокаут гена *Ptpn5* не повлиял на тревожное поведение мышей дикого типа, но повысил тревожность у мышей с нокаутом гена *Fmr1*. ²Нокаут гена *Ptpn5* положительно повлиял на симптомы, вызванные введением РСР, но также вызывал дефицит преимпульсного ингибирования — характерного когнитивного симптома шизофрении.

синаптической и внесинаптической мембране наделяет эту фосфатазу возможностью оказывать модулирующее действие на работу синапсов и участвовать в регуляции выживаемости нервной клетки. Эти функции STEP проявляются при повреждении нервной ткани в следствии ишемии, черепно-мозговых травм, эпилептических припадков, а также в ответе нервной системы на стресс.

Ишемический инсульт возникает в результате нарушения кровообращения участка головного мозга и может быть обусловлен как внезапной закупоркой сосуда, так и хронической дисфункцией сердечно-сосудистой системы. В итоге развивается целый ряд патологических изменений, приводящих к дегенерации нервной ткани. Существенными факторами в развитии этих изменений являются сигнальные каскады с участием киназ ERK и p38 [74] и кальциевая цитотоксичность [75], ключевую роль в механизмах которой играют глутаматные NMDA рецепторы. При экспериментально вызванной локальной ишемии у крыс было зарегистрировано появление неактивной изоформы STEP33 [76], которая является результатом расщепления трансмембранной изоформы STEP61 кальцием в ответ на кальциевый ток [77]. В участках, подверженных локальной ишемии, также наблюдается снижение уровня мРНК гена *Ptpn5* [78]. А при глобальной ишемии участки, менее пострадавшие

от этого воздействия, характеризовались повышенным уровнем мРНК гена *Ptpn5* по сравнению с наиболее пострадавшими участками [78]. STEP может способствовать выживанию нейронов за счет ингибирования киназы p38, запускающей сигнальный каскад апоптоза. Введение в клетку устойчивой к расщеплению мутантной формы STEP, способной связывать и дефосфорилировать p38, защищало клетки от последствий ишемии [79], а недостаток STEP у мышей, наоборот усугублял негативные изменения [80]. Приведенные результаты указывают на нейропротективную роль STEP в процессе развития ишемических повреждений мозга и участие в тонкой регуляции сигнальных каскадов выживания нейронов.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) вызывает гибель нейронов несколькими путями, один из которых опосредован глутаматными NMDA рецепторами с последующей активацией киназы p38 и молекулярных сигнальных каскадов клеточной гибели. Эксперимент на клеточных культурах показал, что STEP может играть регулируемую роль в ответе нервных клеток на повреждение. На культурах клеток ЧМТ моделируется путем растяжения культуры. При этом можно контролировать степень повреждений. При сублетальном воздействии возрастал уровень STEP61 без изменений в уровне STEP33 [81]. В то же время при летальном

воздействии наблюдалось быстрое дефосфорилирование STEP и повышение уровня STEP33 [81]. Наблюдалась корреляция между уровнем этой изоформы и вероятностью гибели нейрона [81]. Таким образом, STEP выступает одним из посредников в регуляции выживаемости нервных клеток в результате травмирующего воздействия в зависимости от степени повреждений. Изучение ЧМТ у мышей показало активацию и увеличение уровня STEP61 в поврежденных участках, а также дефосфорилирование и интернализацию NMDA рецепторов [82]. А ингибирование STEP с помощью TC-2153 противодействовало этим молекулярным изменениям и когнитивным нарушениям.

Стресс — это ответ организма на изменения окружающей и внутренней среды, который запускает регуляторные механизмы для восстановления гомеостаза. Стресс является нормальной реакцией, однако чрезмерный стресс или неспособность организма с ним справиться могут приводить к расстройствам нервной системы. Chih-Hao Yang с коллегами исследовали роль STEP в индивидуальной восприимчивости к стрессу. Оказалось, что у более восприимчивых к стрессу крыс снижен уровень белка STEP [83]. Выключение STEP у контрольных животных с помощью shRNA вызывало большую чувствительность к стрессу, а также снижало плотность дендритных шипиков в гиппокампе в ответ на стресс [83]. А сверхэкспрессия STEP46 с помощью вирусных конструкторов, наоборот, способствовала скорейшему восстановлению после острого

стрессового воздействия. Известно, что пагубные эффекты стресса коррелируют с длительной активацией ERK пути, а STEP, дефосфорилируя ERK, может уравнивать эти процессы [83]. В другой работе Yang с коллегами показали, что помещение в новую среду после стрессового воздействия смягчало влияние стресса на нервную систему и сопровождалось повышением уровня STEP [84]. Что касается длительного стрессового воздействия, то многократный рестрикционный стресс снижал уровень мРНК гена *Ptpn5* у крыс в ядре ложа терминальной полоски, которое активируется в ответ на стресс [85]. При этом наблюдалась повышенная экспрессия NMDA рецепторов и усиление долговременной потенциации, а введение STEP возвращало эти показатели в норму. Хронический стресс от ударов током, мягкий непредсказуемый стресс и стресс в раннем возрасте также снижали уровень мРНК гена *Ptpn5* в ядре ложа терминальной полоски [86–88]. Эти данные указывают на модулирующую роль STEP в ответе нервной системы на стресс, сдвигающую внутриклеточные сигналы в сторону нейропротекции при остром стрессе и активирующую каскады клеточной гибели при долговременном воздействии.

Модулирующая роль STEP в ответе нервной клетки на повреждающее воздействие также проявляется при **эпилепсии** — хроническом неврологическом заболевании, проявляющемся в предрасположенности мозга к внезапным избыточным очагам возбуждения. Однако здесь, напротив,

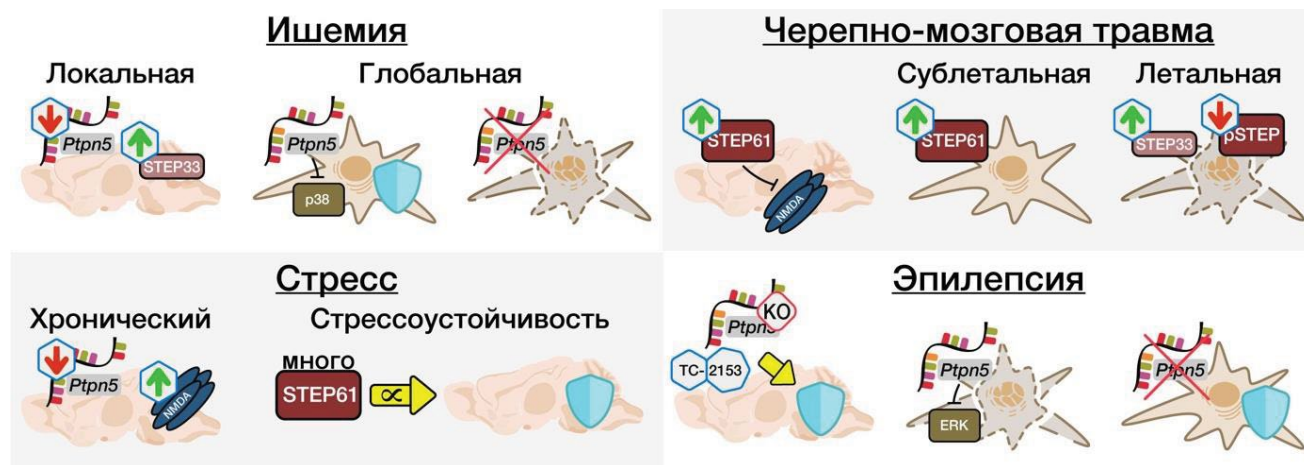


Рис. 4. Нейропротективная и модулирующая роль STEP. При локальной ишемии наблюдается снижение уровня мРНК гена *Ptpn5* и повышение уровня неактивной изоформы STEP33. При глобальной ишемии выживаемость нейронов зависит от уровня мРНК гена *Ptpn5*. При черепно-мозговой травме у мышей наблюдается повышение уровня STEP61 в мозге и снижение фосфорилирования и экспрессии глутаматных NMDA рецепторов. На клеточных культурах сублетальное воздействие приводит к повышению уровня STEP61, а летальное воздействие сопровождается снижением фосфорилирования STEP и повышением уровня STEP33. Стрессоустойчивость у крыс положительно коррелирует (\propto) с уровнем белка STEP61 в мозге, а хронический стресс приводит к снижению уровня мРНК гена *Ptpn5* и повышению экспрессии NMDA рецепторов на синаптической мембране. Выживаемость нейронов при эпилептических припадках отрицательно коррелирует с уровнем экспрессии гена *Ptpn5*. Нокаут этого гена или ингибирование STEP веществом TC-2153 повышает устойчивость мышей к эпилептическим припадкам.

повышенный уровень STEP коррелирует с клеточной гибелью. При эпилептических припадках, вызванных М-холиномиметиком пилокарпином, соматостатин-ные клетки полиморфного слоя гиппокампа, экспрессирующие STEP, более подвержены повреждениям по сравнению с клетками гранулярного слоя, у которых STEP отсутствует [89]. Возможно, это связано с сигнальным путем ERK/MAPK, активация которого во время эпилептического припадка важна для выживания нейрона. STEP может подавлять его, дефосфорилируя киназу ERK. Действительно, при деактивации STEP наблюдалось повышенное фосфорилирование компонентов этого пути и лучшая выживаемость нейронов [89]. Нокаут гена *Ptpn5* у мышей также сопровождался сниженной чувствительностью к эпилептическим приступам, вызванным пилокарпином [90], а TC-2153 снижал чувствительность к аудиогенным припадкам у мышей с нокаутом гена *Fmr1* [47] и к припадкам, вызванным каиновой кислотой, у мышей дикого типа [91]. В то же время есть и противоположные данные, где нокаут STEP повышал чувствительность и смертность среди мышей от припадков, вызванных антагонистом ГАМК [68].

В описанных в этом разделе повреждающих воздействиях выживаемость нейронов зависит от уровня STEP в клетке (рис. 4). Интересно, что хотя в большинстве нейродегенеративных заболеваний наблюдается повышение экспрессии STEP, эта фосфатаза может иметь нейропротективные свойства и способствовать выживанию нейронов при ишемии и черепно-мозговых травмах, а также положительно влиять на стрессоустойчивость.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

STEP является одним из звеньев молекулярных каскадов клетки, на котором сходятся пути патогенеза многих заболеваний ЦНС. Влияние STEP на механизмы этих патологий может быть разносторонним. В болезнях Альцгеймера, Паркинсона и синдроме ломкой X-хромосомы патологические процессы приводят к повышению уровня STEP, что в свою очередь может служить причиной дисрегуляции работы синапсов, ключевых сигнальных каскадов нейрона и приводить к когнитивным и физиологическим нарушениям. В моделях депрессии, шизофрении и РАС имеются противоречивые данные относительно роли STEP в этих заболеваниях. В то же время в болезни Хантингтона и при ишемии уровень STEP снижается, а при стрессе и черепно-мозговых травмах наблюдаются двунаправленные изменения в разных условиях эксперимента. Такая неоднозначная роль STEP обуславливается ее способностью влиять как на сигнальные пути выживания нейронов, так и на пути апоптоза, а также регулировать синаптическую пластичность, долговременную потенцию

и долговременную депрессию. Интересно, что при травмирующих воздействиях, таких как ишемия, эпилепсия и стресс, выживаемость нейронов зависит от уровня STEP в клетке. Все это делает стриатумспецифичную протеинтирозинфосфатазу STEP интересным и важным для нейробиологии объектом исследований и перспективной мишенью для лечения нейродегенеративных и психических заболеваний.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.С. Москалюк — написание текста статьи; А.В. Куликов — редактирование текста статьи; В.С. Науменко — редактирование текста статьи, общее руководство проектом; Е.А. Куликова — редактирование текста статьи, общее руководство проектом.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0010.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lombroso P.J., Murdoch G., Lerner M.* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991. V. 88. No. 16. P. 7242–7246.
2. *Куликова Е.А., Фурсенко Д.В., Баженова Е.Ю., Куликов А.В.* // Молекул. биол. 2020. V. 54. No. 2. P. 313–320.
3. *Boulanger L.M., Lombroso P.J., Raghunathan A., During M.J., Wahle P., Naegele J.R.* // J Neurosci. 1995. V. 15. No. 2. P. 1532–1544.
4. *Bult A., Zhao F., Dirkx R., Raghunathan A., Solimena M., Lombroso P.J.* // Eur J Cell Biol. 1997. V. 72. No. 4. P. 337–344.
5. *Bult A., Zhao F., Dirkx Jr. R., Sharma E., Lukacs E., Solimena M., Naegele J.R., Lombroso P.J.* // The Journal of Neuroscience. 1996. V. 16. No. 24. P. 7821–7831.
6. *Oyama T., Goto S., Nishi T., Sato K., Yamada K., Yoshikawa M., Ushio Y.* // Neuroscience. 1995. V. 69. No. 3. P. 869–880.
7. *Muñoz J.J., Tárrega C., Blanco-Aparicio C., Pulido R.* // Biochem J. 2003. V. 372. No. Pt 1. P. 193–201.
8. *Nguyen T.H., Liu J., Lombroso P.J.* // Journal of Biological Chemistry. 2002. V. 277. No. 27. P. 24274–24279.
9. *Poddar R., Rajagopal S., Shuttleworth C.W., Paul S.* // J Biol Chem. 2016. V. 291. No. 2. P. 813–825.

10. Xu J., Kurup P., Bartos J.A., Patriarchi T., Hell J.W., Lombroso P.J. // *J Biol Chem*. 2012. V. 287. No. 25. P. 20942–20956.
11. Cho I.H., Kim D.H., Lee M.-J., Bae J., Lee K.H., Song W.K. // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. No. 1. P. e54276.
12. Kurup P., Zhang Y., Xu J., Venkitaramani D.V., Haroutunian V., Greengard P., Nairn A.C., Lombroso P.J. // *Journal of Neuroscience*. 2010. V. 30. No. 17. P. 5948–5957.
13. Zhang Y., Venkitaramani D.V., Gladding C.M., Zhang Y., Kurup P., Molnar E., Collingridge G.L., Lombroso P.J. // *Journal of Neuroscience*. 2008. V. 28. No. 42. P. 10561–10566.
14. Paul S., Snyder G.L., Yokakura H., Picciotto M.R., Nairn A.C., Lombroso P.J. // *J Neurosci*. 2000. V. 20. No. 15. P. 5630–5638.
15. Valjent E., Pascoli V., Svenningsson P., Paul S., Enslen H., Corvol J.-C., Stipanovich A., Caboche J., Lombroso P.J., Nairn A.C., Greengard P., Hervé D., Girault J.-A. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. V. 102. No. 2. P. 491–496.
16. Deb I., Poddar R., Paul S. // *J Neurochem*. 2011. V. 116. No. 6. P. 1097–1111.
17. Xu J., Kurup P., Zhang Y., Goebel-Goody S.M., Wu P.H., Hawasli A.H., Baum M.L., Bibb J.A., Lombroso P.J. // *J Neurosci*. 2009. V. 29. No. 29. P. 9330–9343.
18. Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikova E.A., Volcho K.P., Popova N.K. // *Psychopharmacology*. 2012. V. 221. P. 469–478.
19. Xu J., Kurup P., Azkona G., Baguley T.D., Saavedra A., Nairn A.C., Eelman J.A., Pérez-Navarro E., Lombroso P.J. // *J. Neurochem*. 2016. V. 136. No. 2. P. 285–294.
20. Xu J., Kurup P., Baguley T.D., Foscoe E., Eelman J.A., Nairn A.C., Lombroso P.J. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016. V. 73. No. 7. P. 1503–1514.
21. Xu J., Chatterjee M., Baguley T.D., Brouillette J., Kurup P., Ghosh D., Kanyo J., Zhang Y., Seyb K., Ononenyi C., Foscoe E., Anderson G.M., Gresack J., Cuny G.D., Glicksman M.A., Greengard P., Lam T.T., Tautz L., Nairn A.C., Eelman J.A., Lombroso P.J. // 2014. V. 12. No. 8. P. 1–17.
22. Kurup P.K., Xu J., Videira R.A., Ononenyi C., Baltazar G., Lombroso P.J., Nairn A.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. No. 4. P. 1202–1207.
23. Saavedra A., Giralto A., Rue L., Xifro X., Xu J., Ortega Z., Lucas J.J., Lombroso P.J., Alberch J., Pérez-Navarro E. // *Journal of Neuroscience*. 2011. V. 31. No. 22. P. 8150–8162.
24. Goebel-Goody S.M., Wilson-Wallis E.D., Royston S., Tagliatela S.M., Naegele J.R., Lombroso P.J. // *Genes, Brain and Behavior*. 2012. V. 11. No. 5. P. 586–600.
25. Carty N.C., Xu J., Kurup P., Brouillette J., Goebel-Goody S.M., Austin D.R., Yuan P., Chen G., Correa P.R., Haroutunian V., Pittenger C., Lombroso P.J. // *Transl Psychiatry*. 2012. V. 2. No. 7. P. e137–e137.
26. Fatemi S., Folsom T.D., Kneeland R.E., Yousefi M.K., Liesch S.B., Thuras P.D. // *Mol Autism*. 2013. V. 4. No. 1. P. 21.
27. Castonguay D., Dufort-Gervais J., Ménard C., Chatterjee M., Quirion R., Bontempi B., Schneider J.S., Arnsten A.F.T., Nairn A.C., Norris C.M., Ferland G., Bézard E., Gaudreau P., Lombroso P.J., Brouillette J. // *Curr Biol*. 2018. V. 28. No. 7. P. 1079–1089.e4.
28. Chatterjee M., Singh P., Xu J., Lombroso P.J., Kurup P.K. // *Behav Brain Res*. 2020. V. 391. P. 112713.
29. García-Forn M., Martínez-Torres S., García-Díaz Barriga G., Alberch J., Milà M., Azkona G., Pérez-Navarro E. // *Neurobiol Dis*. 2018. V. 120. P. 88–97.
30. Xu J., Kurup P., Baguley T.D., Foscoe E. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015.
31. Khomenko T.M., Tolstikova T.G., Bolkunov A.V., Dolgikh M.P., Pavlova A.V., Korchagina D.V., Volcho K.P., F. S.N. // *Letters in Drug Design & Discovery*. 2009. V. 6. No. 6.
32. Han Y.N., Lambert L.J., De Backer L.J.S., Wu J., Cosford N.D.P., Tautz L. // *Methods Mol Biol*. 2023. V. 2706. P. 167–175.
33. Jamal S., Goyal S., Shanker A., Grover A. // *PLoS ONE*. 2015. V. 10. No. 6. P. e0129370.
34. Lambert L.J., Grotegut S., Celeridad M., Gosalia P., Backer L.J.D., Bobkov A.A., Salaniwal S., Chung T.D., Zeng F.-Y., Pass I., Lombroso P.J., Cosford N.D., Tautz L. // *Int J Mol Sci*. 2021. V. 22. No. 9. P. 4417.
35. Szedlacsek H.S., Bajusz D., Badea R.A., Pop A., Bică C.C., Ravasz L., Mittli D., Mátyás D., Necula-Petrăreanu G., Munteanu C.V.A., Papp I., Juhász G., Hritcu L., Keserű G.M., Szedlacsek S.E. // *J Med Chem*. 2022. V. 65. No. 1. P. 217–233.
36. Bagwe P.V., Deshpande R.D., Juhasz G., Sathaye S., Joshi S.V. // *Cell Mol Neurobiol*. 2023. V. 43. No. 7. P. 3099–3113.
37. Mahaman Y.A.R., Huang F., Embaye K.S., Wang X., Zhu F. // *Front. Cell Dev. Biol*. 2021. V. 9. P. 680118.
38. Glenner G.G., Wong C.W., Quaranta V., Eanes E.D. // *Appl Pathol*. 1984. V. 2. No. 6. P. 357–369.
39. Chin J., Palop J.J., Puoliväli J., Massaro C., Bien-Ly N., Gerstein H., Searce-Levie K., Masliah E., Mucke L. // *J Neurosci*. 2005. V. 25. No. 42. P. 9694–9703.
40. Zhang L., Xie J.-W., Yang J., Cao Y.-P. // *Journal of Neuroscience Research*. 2013. V. 91. No. 12. P. 1581–1590.
41. Zhang Y., Kurup P., Xu J., Carty N., Fernandez S.M., Nygaard H.B., Pittenger C., Greengard P., Strittmatter S.M., Nairn A.C., Lombroso P.J. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. V. 107. No. 44. P. 19014–19019.

42. Zhang Y., Kurup P., Xu J., Anderson G.M., Greengard P., Nairn A.C., Lombroso P.J. // *J Neurochem*. 2011. V. 119. No. 3. P. 664–672.
43. Snyder E.M., Nong Y., Almeida C.G., Paul S., Moran T., Choi E.Y., Nairn A.C., Salter M.W., Lombroso P.J., Gouras G.K., Greengard P. // *Nat Neurosci*. 2005. V. 8. No. 8. P. 1051–1058.
44. Chatterjee M., Kwon J., Benedict J., Kamceva M., Kurup P., Lombroso P.J. // *Exp Brain Res*. 2021. V. 239. No. 3. P. 881–890.
45. Lee Z.-F., Huang T.-H., Chen S.-P., Cheng I.H.-J. // *Pain*. 2021. V. 162. No. 6. P. 1669–1680.
46. Darnell J.C., Van Driesche S.J., Zhang C., Hung K.Y.S., Mele A., Fraser C.E., Stone E.F., Chen C., Fak J.J., Chi S.W., Licatalosi D.D., Richter J.D., Darnell R.B. // *Cell*. 2011. V. 146. No. 2. P. 247–261.
47. Chatterjee M., Kurup P.K., Lundbye C.J., Hugger Toft A.K., Kwon J., Benedict J., Kamceva M., Banke T.G., Lombroso P.J. // *Neuropharmacology*. 2018. V. 128. P. 43–53.
48. Gladding C.M., Fan J., Zhang L.Y.J., Wang L., Xu J., Li E.H.Y., Lombroso P.J., Raymond L.A. // *Journal of Neurochemistry*. 2014. V. 130. No. 1. P. 145–159.
49. Kulikova E.A., Moskaliuk V.S., Rodnyy A.Ya., Bazovkina D.V. // *Adv Gerontol*. 2021. V. 11. No. 1. P. 37–43.
50. Telegina D.V., Kulikova E.A., Kozhevnikova O.S., Kulikov A.V., Khomenko T.M., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Kolosova N.G. // *IJMS*. 2020. V. 21. No. 15. P. 5182.
51. Aarsland D., Cummings J.L., Yenner G., Miller B. // *Am J Psychiatry*. 1996. V. 153. No. 2. P. 243–247.
52. Moechars D., Gilis M., Kuipéri C., Laenen I., Van Leuven F. // *Neuroreport*. 1998. V. 9. No. 16. P. 3561–3564.
53. Lou J.S., Kearns G., Oken B., Sexton G., Nutt J. // *Mov Disord*. 2001. V. 16. No. 2. P. 190–196.
54. Rosenblatt A., Leroi I. // *Psychosomatics*. 2000. V. 41. No. 1. P. 24–30.
55. Moskaliuk V.S., Kozhemyakina R.V., Bazovkina D.V., Terenina E., Khomenko T.M., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Kulikov A.V., Naumenko V.S., Kulikova E. // *Biomed Pharmacother*. 2022. V. 147. P. 112667.
56. Venkitaramani D.V., Moura P.J., Picciotto M.R., Lombroso P.J. // *European Journal of Neuroscience*. 2011. V. 33. No. 12. P. 2288–2298.
57. Blázquez G., Castañé A., Saavedra A., Masana M., Alberch J., Pérez-Navarro E. // *Front Behav Neurosci*. 2018. V. 12. P. 317.
58. Kulikova E.A., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Kulikov A.V. // *LDDD*. 2017. V. 14. No. 8.
59. Kulikova E., Kulikov A. // *Curr Protein Pept Sci*. 2017. V. 18. No. 11. P. 1152–1162.
60. Lanz T.A., Joshi J.J., Reinhart V., Johnson K., Grantham I.L.E., Volfson D. // *PLoS ONE*. 2015. V. 10. No. 3. P. e0121744.
61. Wang K., Tan X., Ding K.-M., Feng X.-Z., Zhao Y.-Y., Zhu W.-L., Li G.-H., Li S.-X. // *Pharmacol Res*. 2024. V. 205. P. 107236.
62. Kulikova E.A., Bazovkina D.V., Evsyukova V.S., Kulikov A.V. // *Bull Exp Biol Med*. 2021. V. 170. No. 5. P. 627–630.
63. Kulikova E.A., Fursenko D.V., Bazhenova E.Yu., Kulikov A.V. // *Mol Biol*. 2021. V. 55. No. 4. P. 604–609.
64. Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikova E.A., Volcho K.P., Khomenko T.M., Salakhutdinov N.F., Popova N.K. // *LDDD*. 2014. V. 11. No. 2. P. 169–173.
65. Kulikova E.A., Khotskin N.V., Illarionova N.B., Sorokin I.E., Bazhenova E.Y., Kondaurova E.M., Volcho K.P. // *Neuroscience*. 2018. V. 394. P. 220–231.
66. Kulikov A., Sinyakova N., Kulikova E., Khomenko T., Salakhutdinov N., Kulikov V., Volcho K. // *LDDD*. 2019. V. 16. No. 12. P. 1321–1328.
67. Sinyakova N.A., Kulikova E.A., Englevskii N.A., Kulikov A.V. // *Bull Exp Biol Med*. 2018. V. 164. No. 5. P. 620–623.
68. Sukoff Rizzo S.J., Lotarski S.M., Stolyar P., McNally T., Arturi C., Roos M., Finley J.E., Reinhart V., Lanz T.A. // *Genes Brain Behav*. 2014. V. 13. No. 7. P. 643–652.
69. Won S., Roche K.W. // *J Physiol*. 2021. V. 599. No. 2. P. 443–451.
70. Folsom T.D., Thuras P.D., Fatemi S.H. // *Schizophrenia Research*. 2015. V. 165. No. 2–3. P. 201–211.
71. Xu J., Hartley B.J., Kurup P., Phillips A., Topol A., Xu M., Ononenyi C., Foscue E., Ho S.-M., Baguley T.D., Carty N., Barros C.S., Müller U., Gupta S., Gochman P., Rapoport J., Ellman J.A., Pittenger C., Aronow B., Nairn A.C., Nestor M.W., Lombroso P.J., Brennand K.J. // *Mol Psychiatry*. 2018. V. 23. No. 2. P. 271–281.
72. Rouillet F.I., Wollaston L., deCatanzaro D., Foster J.A. // *Neuroscience*. 2010. V. 170. No. 2. P. 514–522.
73. Saavedra A., Puigdel·l·vol M., Tyebji S., Kurup P., Xu J., Ginés S., Alberch J., Lombroso P.J., Pérez-Navarro E. // *Molecular Neurobiology*. 2016. V. 53. No. 6. P. 4261–4273.
74. Appunni S., Gupta D., Rubens M., Ramamoorthy V., Singh H.N., Swarup V. // *Mol Neurobiol*. 2021. V. 58. No. 12. P. 6471–6489.
75. Rahi V., Kaundal R.K. // *Life Sci*. 2024. V. 347. P. 122651.
76. Gurd J.W., Bissoon N., Nguyen T.H., Lombroso P.J., Rider C.C., Beesley P.W., Vannucci S.J. // *J Neurochem*. 1999. V. 73. No. 5. P. 1990–1994.
77. Nguyen T.H., Paul S., Xu Y., Gurd J.W., Lombroso P.J. // *J Neurochem*. 1999. V. 73. No. 5. P. 1995–2001.

78. Braithwaite S.P., Xu J., Leung J., Urfer R., Nikolich K., Oksenberg D., Lombroso P.J., Shamloo M. // *Eur J of Neuroscience*. 2008. V. 27. No. 9. P. 2444–2452.
79. Deb I., Manhas N., Poddar R., Rajagopal S., Allan A.M., Lombroso P.J., Rosenberg G.A., Candelario-Jalil E., Paul S. // *Journal of Neuroscience*. 2013. V. 33. No. 45. P. 17814–17826.
80. Rajagopal S., Yang C., DeMars K.M., Poddar R., Candelario-Jalil E., Paul S. // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2021. V. 93. P. 141–155.
81. Mesfin M.N., Von Reyn C.R., Mott R.E., Putt M.E., Meaney D.F. // *Journal of Neurotrauma*. 2012. V. 29. No. 10. P. 1982–1998.
82. Carvajal F.J., Cerpa W. // *Antioxidants*. 2021. V. 10. No. 10. P. 1575.
83. Yang C.-H., Huang C.-C., Hsu K.-S. // *J Neurosci*. 2012. V. 32. No. 22. P. 7550–7562.
84. Yang C., Huang C., Hsu K. // *The Journal of Physiology*. 2006. V. 577. No. 2. P. 601–615.
85. Dabrowska J., Hazra R., Guo J.-D., Li C., Dewitt S., Xu J., Lombroso P.J., Rainnie D.G. // *Biol Psychiatry*. 2013. V. 74. No. 11. P. 817–826.
86. Daniel S.E., Menigoz A., Guo J., Ryan S.J., Seth S., Rainnie D.G. // *Neuropharmacology*. 2019. V. 150. P. 80–90.
87. Hu P., Liu J., Maita I., Kwok C., Gu E., Gergues M.M., Kelada F., Phan M., Zhou J.-N., Swaab D.F., Pang Z.P., Lucassen P.J., Roepke T.A., Samuels B.A. // *J. Neurosci*. 2020. V. 40. No. 12. P. 2519–2537.
88. Hu P., Maita I., Phan M.L., Gu E., Kwok C., Dieterich A., Gergues M.M., Yohn C.N., Wang Y., Zhou J.-N., Qi X.-R., Swaab D.F., Pang Z.P., Lucassen P.J., Roepke T.A., Samuels B.A. // *Transl Psychiatry*. 2020. V. 10. No. 1. P. 396.
89. Choi Y.-S., Lin S.L., Lee B., Kurup P., Cho H.-Y., Naegele J.R., Lombroso P.J., Obrietan K. // *J. Neurosci*. 2007. V. 27. No. 11. P. 2999–3009.
90. Briggs S.W., Walker J., Asik K., Lombroso P., Naegele J., Aaron G. // *Epilepsia*. 2011. V. 52. No. 3. P. 497–506.
91. Walters J.M., Kim E.C., Zhang J., Jeong H.G., Bajaj A., Baculis B.C., Tracy G.C., Ibrahim B., Christian-Hinman C.A., Llano D.A., Huesmann G.R., Chung H.J. // *Epilepsia*. 2022. V. 63. No. 5. P. 1211–1224.

Current Concepts of the Role of Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase STEP in the Pathological and Neurodegenerative Processes in the Brain

V. S. Moskaliuk¹, A. V. Kulikov¹, V. S. Naumenko¹, and E. A. Kulikova¹

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (SB RAS), Novosibirsk, Russia*

Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) is an intracellular protein involved in key signaling cascades of the nerve cell. By regulating the membrane localization of glutamate receptors and the activity of several signaling kinases, STEP can influence processes of neuroplasticity and synaptic function, and participate in the regulation of behavior, cognition, and memory. STEP can act as an intermediary between the brain's neurotrophic, dopaminergic, and glutamatergic systems. Dysregulation of STEP expression and function is observed in several neurodegenerative and psychiatric disorders, as well as in aging and traumatic brain injuries. In Alzheimer's and Parkinson's diseases, as well as in fragile X syndrome, there is an increase in STEP activity and expression in the brains of patients and in animal models of these diseases. There is evidence of this phosphatase's involvement in the mechanisms of depression, autism spectrum disorders, schizophrenia, and anxiety; however, different model systems and experimental conditions yield contradictory results. STEP plays a modulatory role in the nervous system's response to traumatic brain injuries, ischemic stroke, epileptic seizures, and stress exposure. Due to STEP's involvement in the pathogenesis of numerous nervous system disorders, this phosphatase has been actively studied over the past decade. In this review, we comprehensively examine the existing data on the role of STEP phosphatase in the functioning of CNS and in the mechanisms of disease development and the response of nerve cells to damaging influences.

Keywords: Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP), Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, fragile X syndrome, depression, anxiety, aggression, schizophrenia, autism, epilepsy, ischemia, aging, stress, traumatic brain injuries

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА КАК МОДУЛЯТОР ПОСТСТРЕССОРНОГО НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ПРАКТИК

© 2024 г. И. Г. Шалагинова^{1, *}, С. П. Лузикова¹, А. Э. Вылегжанина^{1, 2}, Д. С. Кацеров¹

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: shalaginova_i@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2024 г.

После доработки 04.08.2024 г.

Принята к публикации 12.08.2024 г.

Согласно текущей гипотезе, микробиота кишечника оказывает значительное влияние на центральную нервную систему и поведение через различные механизмы, включая модуляцию иммунной системы и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГН-оси), эпигенетическую регуляцию экспрессии генов, производство метаболитов. Ось микробиота-кишечник-мозг является одной из ключевых мишеней для исследований механизмов болезни Альцгеймера, патологической тревоги, расстройств настроения, аутизма. Обсуждается, что в развитии данных патологий определенную роль играет постстрессорное нейровоспаление, которое может быть связано с изменениями в микробиоте. Однако обнаруженные “дисбиотические паттерны” в микробиомах модельных животных в разных моделях стресса и у пациентов, страдающих психопатологиями, не являются специфичными и, возможно, вторичны по отношению к болезни. Отсутствие понимания механизмов, посредством которых микробиота кишечника задействована в патогенезе нейро- и психопатологий, сдерживает трансляцию результатов, полученных на модельных животных. В обзоре обсуждаются основные методологические проблемы исследований оси “микробиота-кишечник-мозг”, рассматриваются пути их решения.

Ключевые слова: ось микробиота-кишечник-мозг, микробиота кишечника, нейровоспаление, стресс, психопатологии

DOI: 10.31857/S1027813324040057, EDN: ENFGZC

ВВЕДЕНИЕ

Микробиота кишечника — сложная экосистема бактерий, вирусов, грибов и архей, населяющих кишечник человека и животных. С одной стороны, данные микроорганизмы играют ключевую роль в поддержании функционального состояния многих систем “организма-хозяина”: участвуют в пищеварении, синтезе витаминов, метаболизме лекарств, а также в модуляции иммунных процессов. С другой стороны, в последние годы микробиота кишечника стала предметом активного изучения в связи с ее возможным влиянием на широкий спектр патологических процессов. Так, сегодня сложно найти нейро- или психопатологию, в развитии которой не “подозревали” бы микробиоту ЖКТ. Ось микробиота-кишечник-мозг является одной из ключевых мишеней для исследований болезни Альцгеймера [1], социального тревожного расстройства [2], расстройств настроения [3, 4].

С точки зрения генетического разнообразия микробиом может превосходить размер генома организма-хозяина более чем на три порядка, а значит потенциально способен синтезировать огромное количество метаболитов, влияющих на физиологию хозяина [5].

Кроме толстого кишечника, микробные ниши существуют по всему ЖКТ, в частности, в полости рта (например, на языке, зубном налете, поверхностях десен) и тонком кишечнике [6].

Под термином “ось микробиота-кишечник-мозг” понимают двунаправленную связь между микробиомом и мозгом хозяина. Существует несколько способов, с помощью которых происходит эта коммуникация: микробы способны продуцировать нейрорактивные соединения, такие как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), могут модулировать иммунную систему и этот иммунный сигнал транслируется в мозг, так же обнаружена

прямая возможность стимуляции микробными метаболитами блуждающего нерва [7]. Кроме того, микробиота может влиять на эпигенетические модификации, что приводит к изменению экспрессии генов в клетках как кишечника, так и мозга. Такие КЦЖК как бутират, ацетат и пропионат могут ингибировать гистоновые деацетилазы (HDACs), что приводит к изменениям в ацетилировании гистонов [8].

Одной из ключевых дискуссий последних лет является вопрос о том, как стресс влияет на состав и функциональные характеристики микробиоты кишечника. Психологические и физические стрессоры как острые, так и хронические приводят к изменениям в микробиоте, которые, возможно, могут способствовать развитию нейровоспаления и нарушений поведения. Понимание этих взаимосвязей важно для разработки новых терапевтических стратегий при стресс-ассоциированных расстройствах, таких как депрессия и тревожные расстройства.

Однако зачастую обнаруженные “дисбиотические паттерны” в микробиомах человека и модельных животных не являются специфичными и выявляются при множестве патологических состояний, высказывается мнение, что они вторичны по отношению к болезни [9]. Большинство исследований в области эффектов стресса на микробное сообщество ЖКТ являются по сути корреляционными [для обзора 10] и поэтому очень ограниченно транслируются в клинику.

Данный обзор направлен на анализ основных проблем и ограничений в текущих исследованиях оси “микробиота-кишечник-мозг”, а также на рассмотрение путей улучшения методологических подходов.

ДИСБИОТИЧЕСКИЕ ПАТТЕРНЫ В МОДЕЛЯХ СТРЕССА И ПРИ ПСИХОПАТОЛОГИЯХ

Микробное сообщество кишечника может очень динамично изменяться в ответ на внешние и внутренние факторы, такие как диета, стресс, инфекции и применение антибиотиков [11, 12]. Эти изменения могут быть как временными, так и устойчивыми, в зависимости от силы и длительности воздействия факторов. Например, кратковременное изменение диеты может быстро поменять состав микробиоты, но эти изменения могут быть обратимыми при возврате к прежнему режиму питания [12].

С другой стороны, разнообразие и композиция микробиоты ЖКТ является индивидуальной особенностью каждого организма и может быть связана с генетическими факторами “организма-хозяина”. Исследования показывают, что генетический фон может влиять на состав и функциональность

микробиоты. Близнецовые исследования демонстрируют, что генетически идентичные близнецы имеют более схожую микробиоту, чем дизиготные близнецы [13].

Исследования оси “микробиота-кишечник-мозг” на модельных животных показывают, что наиболее хорошо воспроизводимый и значимый эффект микробиоты — это модуляция социального поведения и реакция организма на стресс [14].

Стресс и социальное поведение тесно переплетены; воздействие хронического стресса влияет на социальные взаимодействия, и, наоборот, социальная среда является предиктором способности справляться со стрессом. Оба эти процесса связаны с похожими нейронными сетями, что указывает на общие механизмы регуляции [2].

Стресс изменяет состав кишечной микробиоты у различных видов, и, наоборот, кишечная микробиота формирует чувствительность к стрессу, главным образом посредством модуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГН-оси) [10].

Исследования показывают, что стрессоры (физические, социальные и психо-эмоциональные) могут значительно изменять микробиоту, что, в свою очередь, влияет на поведение и физиологические реакции организма.

Показано, что социальная изоляция у мышей изменяет соотношение бактерий *Firmicutes* к *Bacteroidetes*, что приводит к снижению уровня микроорганизмов, производящих КЦЖК, и увеличению количества бактерий, связанных с воспалением [15]. Изучают роль кишечной микробиоты в формировании дефицита социального поведения, используя селектированные линии мышей, обладающих доминантными (Dom) или субмиссивными (Sub) чертами поведения. Мыши линии Sub демонстрируют нарушения социального взаимодействия, депрессивно- и тревожноподобное поведение, а также системное воспаление.

Кроме того, у мышей линии Sub было выявлено увеличение количества условно-патогенных бактерий, таких как *Bacteroides* и *Clostridium* по сравнению с линией Dom. Так же было выявлено снижение показателей относительной представленности *Lactobacillus* и *Faecalibacterium* [16]. При этом, у линии Sub ранее обнаружены повышение уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, таких как интерлейкин-6 (IL-6) и интерлейкин-1 β (IL-1 β) [17]. Авторы предполагают, что нарушения в микробиоте кишечника могут способствовать развитию воспалительных процессов, нарушению барьерной функции кишечника и, как следствие, нарушениям социального взаимодействия у данных животных.

Исследования на GF-мышцах (germ free, выращенные в стерильных условиях, “безмикробные

мышь”) и SPF-мышь (specific pathogen free, без специфических патогенов) показали, что микробиота влияет на развитие ГГН-оси и, следовательно, на реакцию на стресс. Мыши, выращенные в стерильных условиях, демонстрируют повышенную активность ГГН-оси и более высокий уровень АКГТ и кортикостерона в ответ на стрессор по сравнению с SPF-мышью [18]. Отсутствие микробиоты у GF-мышей связывают с наблюдающимися у них признаками нейровоспаления в тех структурах мозга, которые вовлечены в патогенез связанных со стрессом расстройств [19]. Наряду с высокими уровнями провоспалительных цитокинов, таких как IL1 β в мозге GF-животных выявляют снижение нейротрофического фактора мозга BDNF [20].

Изучается и действие физических стрессоров. Было обнаружено, что тепловой стресс значительно изменяет состав и разнообразие микробиоты кишечника: увеличивается количество представителей *Firmicutes* и уменьшается *Bacteroidetes* [21].

В модели стресса, связанного с длительным обездвиживанием показано, что хронический стресс приводит к изменениям в микробиоте и повышает восприимчивость мышей к колиту. По сравнению с контрольной группой, у мышей, подвергшихся стрессу, были повышены уровни функциональных таксономических единиц (OTU), способствующих воспалению и относящихся к *Helicobacter*, *Peptostreptococcaceae*, *Streptococcus* и *Enterococcus faecalis*, но снижены уровни *Rikenella*, *Roseburia* и *Lachnospiraceae* [22].

Одна из самых популярных моделей стресса на ранних стадиях онтогенеза — материнская депривация. У новорожденных крысят ранняя разлука с матерью приводит к сохраняющимся во взрослом возрасте изменениям в работе ГГН-оси, а также оказывает длительный эффект на состав микробиоты у потомства [23].

Наиболее воспроизводимое изменение в микробиоме в ответ на большинство стрессоров — снижение представленности лактобактерий. Впервые продемонстрированное в мышинной модели стресса более четырех десятилетий назад [24] это открытие было впоследствии воспроизведено на макаках-резусах [25], крысах, испытывающих стресс от разлуки с матерью в раннем возрасте [23], и во многих других моделях [для обзора 7].

Обнаруженные на животных изменения микробной композиции ЖКТ в ответ на стрессоры обладают высоким трансляционным потенциалом, поскольку известно, что стресс является ключевым пусковым фактором для многих нейро- и психопатологий.

Однако обнаруженные в исследованиях на людях изменения микробной композиции не являются специфичными для большинства

психопатологий. Так, мета-анализ 59 исследований типа “случай-контроль” выявил трансдиагностическую закономерность, то есть общую для различных психических расстройств тенденцию, связывающую нарушения микробиоты кишечника с депрессией, биполярным расстройством, шизофренией и тревожными расстройствами. В частности, было обнаружено уменьшение количества “противовоспалительных” бактерий, продуцирующих бутират, и увеличение количества бактерий, способствующих воспалению [26].

Традиционно патофизиологию депрессии связывают с нейромедиаторными нарушениями, дисфункцией ГГН-оси, нейротрофическими факторами и циркадными ритмами [27]. Исследования последних лет показывают, что у пациентов, страдающих депрессивными расстройствами, обнаруживаются изменения в микробной композиции кишечника, по сравнению со здоровыми испытуемыми [для обзора 28]. Однако результаты данных исследований зачастую контрастируют друг с другом.

В одном исследовании количество бифидобактерий и лактобактерий было снижено у пациентов с депрессией [29] по сравнению с контролем. В другом исследовании было отмечено увеличение у пациентов с депрессией показателей α -разнообразия в стуле, чего не наблюдалось у пациентов, которые ответили на лечение. Показано, что представленность *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria* увеличена, а *Firmicutes* — уменьшена у пациентов по сравнению с контролем, обнаружена отрицательная корреляция между фекалибактериями и тяжестью депрессивных симптомов [30].

Другие авторы показали, напротив, снижение микробного разнообразия в стуле пациентов с депрессией по сравнению с контролем [31].

Мета-анализ, включивший данные 34 исследований (1519 пациентов с различными психопатологиями и 1429 здоровых испытуемых), показал, что данные разных исследователей контрастируют друг с другом. Хотя было выявлено значимое снижение микробного разнообразия у пациентов по сравнению с контрольной группой, такое снижение стабильно наблюдалось только при биполярном расстройстве. Для других расстройств результаты были менее однозначными: не было значимых различий по индексам Шеннона и Симпсона, а различия в бета-разнообразии стабильно наблюдались только при депрессии, психозах и шизофрении [26].

Несмотря на контрастирующие экспериментальные данные, несомненно, что стрессоры изменяют состав микробиоты, что может способствовать развитию нейровоспаления через несколько механизмов: нарушение производства КЦЖК, эпигенетическая регуляция генов, модуляция

ГГН-оси. Эти изменения в микробиоте могут способствовать развитию и поддержанию психопатологических состояний, таких как депрессия и тревожные расстройства. Таким образом, кишечная микробиота является важным модулятором постстрессорного нейровоспаления, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований в данной области для разработки новых терапевтических стратегий.

Однако для перехода к клиническому использованию данных необходимо устранить противоречия в результатах исследований оси “микробиота-кишечник-мозг”. В настоящее время это затруднено из-за колоссального количества данных, ежегодно получаемых в ходе клинических и доклинических исследований. Кроме того, выделяются несколько методологических проблем в данной области, наиболее важные из которых обсуждаются в следующем разделе обзора.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ОСИ МИКРОБИОТА-КИШЕЧНИК МОЗГ

Среди основных методологических проблем исследований “оси микробиота-кишечник-мозг” можно выделить следующие:

- корреляционный характер большинства проводимых исследований;
- авторы, пытающиеся установить причинно-следственные связи, например, путем трансплантации стула пациентов GF-мышам, зачастую публикуют только положительные результаты;
- недостатки экспериментальных дизайнов, связанные с игнорированием возможных спонтанных изменений микробиоты и индивидуальных различий микробной композиции;
- чрезмерная стандартизация в экспериментах повышает воспроизводимость за счет снижения внешней валидности;
- ограничения, связанные с несовершенством методик для оценки поведения животных, напоминая психопатологические симптомы у человека;
- недостатки, связанные с использованием методов секвенирования и биоинформатического анализа данных.

Поскольку точное определение “нормального” или “здорового” микробиома еще не установлено [32], термин “дисбиоз” используют для обозначения изменений в микробиоме, связанных с определенным заболеванием или состоянием, по сравнению с контрольными показателями. В большинстве случаев не установлено, являются ли такие “дисбиотические” микробиомы причиной или следствием заболевания, или оба явления вызваны

третьим фактором [14]. Для того чтобы микробиом стал надежной мишенью для вмешательств, требуется подтверждение этих причинно-следственных связей.

Одна из возможностей установить причинно-следственные связи, это трансплантация стула от здоровых доноров и пациентов безмикробным GF-мышам. Такие исследования показывают, что микробиота больных людей может воспроизводить патологии у грызунов [для обзора 14]. Однако, к таким исследованиям есть ряд критических замечаний.

Отрицательные результаты часто не публикуются, что создает иллюзию, будто 9 из 10 исследований, в которых была произведена трансплантация стула, имеют положительные результаты. Предварительная регистрация рассматривается сегодня как одна из основных возможностей коррекции “публикационных искажений” [33]. Такая регистрация подразумевает предварительное документирование гипотез и плана предполагаемого анализа. Это позволяет избежать выборочного представления результатов на основе значимости различий.

Считают, что низкая воспроизводимость и трудности с трансляцией в клинику результатов исследований оси “микробиота-кишечник-мозг” связаны с большим количеством ошибок первого рода (ложноположительные результаты), практика предварительной регистрации способна уменьшить их количество [33].

В исследованиях по трансплантации стула от человека к животным зачастую используют псевдореплики, формируя выборку, когда стул от одного донора пересаживают нескольким мышам и считают размером выборки количество мышей, а не доноров, при этом именно последние представляют собой биологические повторности.

Не тестируется дисбиоз у пациентов и животных до вмешательства [14]. Например, в исследовании эффекта психологического стрессора (наблюдение за конспецификами, которые подвергаются действию электрического тока) на мышах показано, что относительная представленность таких таксонов как *Proteobacteria* и *Actinobacteriota* выше у стрессированных по сравнению с контролем; представленность родов *Parasutterella* и *Rikenellaceae_RC9_gut_group* также повышена у стрессированных мышей, в то время как *Bacteroides*, *Alistipes*, и *Lactobacillus* снижены у стрессированных по сравнению с контролем. В ответ на стресс также снижается показатель разнообразия (Chao1 index) у стрессированных животных по сравнению с контролем [34]. При этом авторы данного исследования не проводили забор стула у животных обеих групп до начала эксперимента и, таким образом, нет уверенности, что указанные различия связаны именно с действием

стрессора, а не с какими-либо неучтенными факторами (например, “эффект клетки”). Кроме того, в данной работе провели трансплантацию стула от стрессированных мышей животным, на протяжении 5 дней принимавшим антибиотик. Авторы делают вывод о том, что пересадка микробиоты стрессированных животных повышает чувствительность к стрессу, поскольку изменились параметры в поведенческих тестах, однако не проводился забор стула и анализ микробиоты ни в ответ на антибиотикотерапию, ни после трансплантации.

В целом, несмотря на рекомендации учитывать возможные динамические процессы в составе микробиоты интактных животных [35], в большинстве исследований забор кала для анализа в контрольной и экспериментальной группах проводится однократно [например, 34, 36]. В то же время имеются данные о значительных изменениях показателей альфа-разнообразия у интактных половозрелых грызунов, содержащихся в стандартных условиях, если отбор биоматериала проводить каждую неделю [37]. Проведенные нами исследования постстрессорных изменений микробиоты кишечника у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы показали, что забор материала у всех животных до начала эксперимента позволяет установить наличие исходных различий в представленности некоторых таксонов в контрольных и экспериментальных группах [38].

Поскольку грызуны являются копрофагами, микробиом фекалий животных, живущих в одной клетке, со временем становится более однородным (так называемый “эффект клетки”), поэтому эксперименты необходимо проводить в нескольких клетках и учитывать возможное влияние этого фактора [35].

С учетом вышесказанного, а также того, что даже генетически идентичные грызуны могут отличаться по-своему микробиому из-за неконтролируемых факторов окружающей среды, представляется важным, во-первых, делать забор стула у всех животных до начала эксперимента, а также в нескольких временных точках не только у экспериментальной, но и у контрольной группы. Это позволит, с одной стороны, убедиться, что микробиота контрольных животных изначально значимо не отличалась от экспериментальных групп и сравнения с контролем имеют смысл. Кроме того, это позволит убедиться, что не имело место спонтанное изменение микробной композиции. Еще одно преимущество такого дизайна в том, что он позволяет проводить не только сравнения “кейс\контроль”, но и оценить постстрессорные изменения микробиоты кишечника у одних и тех же животных, что важно в перспективе развития персонализированных подходов.

Еще один способ приблизиться к пониманию причинно-следственных связей — это наблюдение за последствиями коррекции микробного сообщества. Есть данные, что определенные штаммы бактерий могут обращать вспять различные эффекты стресса, например введение пробиотиков снижает выраженность тревожно-подобных и депрессивно-подобных симптомов у стрессированных мышей [для обзора 39].

Однако, как и во всех исследованиях, где оцениваемыми переменными является сложное поведение животных, наблюдаются трудности с воспроизводимостью результатов даже в рамках одной лаборатории [40]. Наряду с методическими проблемами, связанными с методами секвенирования и биоинформатического анализа, используемыми для идентификации микроорганизмов, ключевой причиной таких расхождений в данных являются ограничения классических поведенческих тестов.

В большинстве работ, анализ поведения животных в ответ на стрессор — это однократный 5-минутный срез, поэтому выводы о том, что изменения в микробиоме и поведении являются одновременными, а потому вероятнее всего связанными, преувеличены. Критерии “похожести на болезнь человека” часто расплывчаты, неопределены или просто описаны постфактум [14].

В отношении классических поведенческих методик, таких как “Открытое поле”, “Приподнятый крестообразный лабиринт”, которые активно используются в доклинических исследованиях оси “микробиота-кишечник-мозг” в настоящее время обсуждают ряд методологических проблем, наиболее важными из которых являются: несоответствие времени тестирования поведения суточным ритмам активности грызунов; ограниченное время тестирования (в среднем 5 минут); невозможность лонгитюдного наблюдения, так как многие тесты нет смысла проводить повторно из-за явления габитуации; игнорирование индивидуальных различий.

Один из способов преодолеть указанные ограничения поведенческих тестов, который активно обсуждается в литературе — широкое внедрение автоматизированных систем и технологий, позволяющих вести лонгитюдное наблюдение за активностью животных в домашних клетках [41]. Долговременный мониторинг поведения позволил бы установить более точную динамику развития поведенческих симптомов стресса и сопоставить ее с динамикой изменений в композиции микробного сообщества ЖКТ. Это даст возможность учесть индивидуальные, в том числе генетически детерминированные, различия в микробиоте, что обеспечит более точное и персонализированное понимание взаимодействий между стрессом, микробиотой и поведением.

Нужно учитывать и ограничения метода секвенирования гена 16S рРНК, изначально разработанного для изучения микробного разнообразия в экологических системах и в применении к исследованию количественного соотношения микробов в ЖКТ могут возникнуть следующие трудности.

Одно из важнейших критических замечаний связано с тем, что микробная нагрузка (общее количество микроорганизмов) зачастую существенно варьируется между образцами. В этом случае относительное профилирование, которое выражает количество различных таксонов в процентах от общего числа секвенированных микроорганизмов, может вводить в заблуждение. Если общее количество микроорганизмов варьируется, это может искусственно изменить видимую долю каждого таксона. Например, в образце с низким общим количеством микроорганизмов один таксон может казаться более распространенным, чем в образце с высоким общим количеством микроорганизмов, даже если абсолютное количество этого таксона одинаково в обоих образцах. Поскольку относительное профилирование не предоставляет информацию об абсолютных количествах микроорганизмов, это затрудняет сопоставление данных с физиологическими параметрами или концентрациями метаболитов, которые измеряются в абсолютных единицах. Для решения этих проблем предлагают использовать подходы, которые комбинируют относительное профилирование с методами для оценки абсолютного количества микроорганизмов, такими как проточная цитометрия или использование внутренних стандартов в секвенировании [42].

Ген 16S рРНК обладает высокой степенью консервативности, что затрудняет различие между близкородственными видами. Это может привести к неточностям в идентификации микроорганизмов на уровне вида и даже рода и таким образом снижает разрешающую способность метода. ПЦР-амплификация, используемая для подготовки образцов к секвенированию, может вносить систематические ошибки. Некоторые последовательности амплифицируются с разной эффективностью, что искажает реальное соотношение микроорганизмов. Праймеры, используемые для амплификации гена 16S рРНК, могут не одинаково эффективно связываться с ДНК разных микроорганизмов. Это может привести к тому, что некоторые виды будут представлены в результатах в меньшем количестве, чем они реально присутствуют в образце. И, наконец, поскольку разные организмы содержат разное количество копий гена 16S, зачастую наблюдается искажение данных о представленности. Каждая копия гена 16S рРНК будет амплифицирована и секвенирована, а это значит, что организмы с большим количеством копий гена 16S рРНК будут представлены в данных в большем количестве,

чем те, у которых копий меньше, даже если их общее количество в образце одинаково [43].

Таким образом, секвенирование 16S рРНК дает скорее информацию о наличии или отсутствии определенных микроорганизмов и их относительной пропорции, но не точные количественные данные. Возможно ртПЦР-верификация должна стать таким же золотым стандартом в метагеномных исследованиях, каковой стала в транскриптомных. Также следует рассмотреть внедрение методов, таких как проточная цитометрия или использование внутренних стандартов [44] для более точного количественного анализа микробиоты.

Ну и наконец, еще одним ограничением в практическом применении, получаемых в микробиомных исследованиях результатов, является отсутствие понимания механизмов, которые стоят за наблюдаемыми изменениями микробиоты в ответ на стресс или у пациентов с психопатологиями. Это не позволяет быть уверенными, что некоторые изменения не могут быть компенсаторными реакциями на заболевание, тогда их “коррекция” может быть вредной.

Таким образом, значимость кишечной микробиоты как модулятора постстрессорного нейровоспаления и ее влияние на центральную нервную систему и поведение не вызывает сомнения. Тем не менее, методологические ограничения, которые обсуждались выше, затрудняют перенос полученных результатов в клиническую практику. Перспективы исследований в этой области определяются успехами в разработке более точных и надежных методик для количественного анализа микробиоты, улучшением экспериментальных дизайнов, а также появлением более валидных моделей поведенческих расстройств и методов оценки поведения животных. Преодоление этих методологических проблем будет способствовать лучшему пониманию сложных взаимодействий между микробиотой, стрессом и нейропсихопатологиями, открывая путь для разработки новых, более эффективных терапевтических вмешательств.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williams Z.A., Lang L., Nicolas S., Clarke G., Cryan J., Vauzour D., Nolan Y.M. // Microb. Biotechnol. 2024. Т. 17. № 4. e14462.

2. Sherwin E., Bordenstein S.R., Quinn J.L., Dinan T.G., Cryan J.F. // *Sci.* 2019. T. 366. № 6465. eaar2016.
3. Parashar A., Udayabanu M. // *Europ. Neuropsychopharmacol.* 2016. T. 26. № 1. P. 78–91.
4. Lachmansingh D.A., Lavelle A., Cryan J.F., Clarke G. // *Curr. Top. in Behav. Neurosci.* 2023. T. 66. P. 175–216.
5. Sender R., Fuchs S., Milo R. // *PLoS Biol.* 2016. T. 14. № 8. e1002533.
6. Li X., Liu Y., Yang X., Li C., Song Z. // *Front. Microbiol.* 2022. T. 13. 895537.
7. Cryan J.F., O'Riordan K.J., Cowan C.S.M., Sandhu K.V., Bastiaanssen T.F.S., Boehme M., Codagnone M.G., Cusotto S., Fulling C., Golubeva A.V., Guzzetta K.E., Jaggar M., Long-Smith C.M., Lyte J.M., Martin J.A., Molinero-Perez A., Moloney G., Morelli E., Morillas E., O'Connor R., Cruz-Pereira J.S., Peterson V.L., Rea K., Ritz N.L., Sherwin E., Spichak S., Teichman E.M., van de Wouw M., Ventura-Silva A.P., Wallace-Fitzsimons S.E., Niall Hyland, Clarke G., Dinan T.G. // *Physiol. Rev.* 2019. T. 99. № 4. P. 1877–2013.
8. Шалагинова И.Г., Мацкова Л.В., Гуничева Н.М., Ваколюк И.А. // *Экологич. генет.* 2019. T. 17. № 4. С. 91–102.
9. Duvallet C., Gibbons S.M., Gurry T., Irizarry R.A., Alm E.J. // *Nat. Comm.* 2017. T. 8. № 1. 1784.
10. Foster J.A., Rinaman L., Cryan J.F. // *Neurobiol. of Str.* 2017. T. 7. P. 124–136.
11. Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R. // *Nat.* 2012. T. 489. № 7415. P. 220–230.
12. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Turnbaugh P.J. // *Nat.* 2014. T. 505. № 7484. P. 559–563.
13. Goodrich J.K., Waters J.L., Poole A.C., Sutter J.L., Koren O., Blekman R., Ley R.E. // *Cell.* 2014. T. 159. № 4. P. 789–799.
14. Walter J., Armet A.M., Finlay B.B., Shanahan F. // *Cell.* 2020. T. 180. № 2. P. 221–232.
15. Wang Y., Ullah H., Deng T., Ren X., Zhao Z., Xin Y., Qiu J. // *Neurosci. Lett.* 2024. T. 826. 137714.
16. Agranyoni O., Sur D., Amidror S., Shidlovsky N., Bagaev A., Yissachar N., Navon-Venezia S. // *BMC Med.* 2024. T. 22. № 1. 182.
17. Bairachnaya M., Agranyoni O., Antoch M., Michaelevski I., Pinhasov A. // *Aging.* 2019. T. 11. № 21. P. 9901–9911.
18. Sudo N., Chida Y., Aiba Y., Sonoda J., Oyama N., Yu X.N., Kubo C., Koga Y. // *J. Physiol.* 2004. T. 558. P. 263–275.
19. Alam R., Abdolmaleky H.M., Zhou J. // *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 2017. T. 174. № 6. P. 651–660.
20. Gur T.L., Shay L., Palkar A.V., Fisher S., Varaljay V.A., Dowd S., Bailey M.T. // *Brain. Behav. Immun.* 2017. T. 64. P. 50–58.
21. Qu Q., Li H., Bai L., Zhang S., Sun J., Lv W., Ye C., Liu S., Shi D. // *Indian J. Microbiol.* 2021. T. 61. P. 338–347.
22. Gao X., Cao Q., Cheng Y., Zhao D., Wang Z., Yang H., Wu Q., You L., Wang Y., Lin Y., Li X., Wang Y., Bian J.S., Sun D., Kong L., Birnbaumer L., Yang Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. T. 115. № 13. P. 2960–2969.
23. O'Mahony S.M., Hyland N.P., Dinan T.G., Cryan J.F. // *Psychopharmacol. (Berl).* 2011. T. 214. № 1. P. 71–88.
24. Tannock G.W., Savage D.C. // *Infect. Immun.* 1974. T. 9. № 3. P. 591–598.
25. Bailey M.T., Coe C.L. // *Dev. Psychobiol.* 1999. T. 35. P. 146–155.
26. Nikolova V.L., Smith M.R.B., Hall L.J., Cleare A.J., Stone J.M., Young A.H. // *JAMA Psychiat.* 2021. T. 78. № 12. C. 1343–1354.
27. Hasler G. // *Wor. Psychiat.* 2010. T. 9. № 3. P. 155–161.
28. Barandouzi Z.A., Starkweather A.R., Henderson W.A., Gyamfi A., Cong X.S. // *Front. Psychiat.* 2020. T. 11. 541.
29. Aizawa E., Tsuji H., Asahara T., Takahashi T., Teraishi T., Yoshida S., Ota M., Koga N., Hattori K., Kunugi H. // *J. Aff. Disord.* 2016. T. 202. P. 254–257.
30. Jiang H., Ling Z., Zhang Y., Mao H., Ma Z., Yin Y., Wang W., Tang W., Tan Z., Shi J., Li L., Ruan B. // *Brain Behav. Immun.* 2015. T. 48. P. 186–194.
31. Kelly J.R., Borre Y., O'Brien C., Patterson E., El Aidy S., Deane J., Kennedy P.J., Beers S., Scott K., Moloney G., Hoban A.E., Scott L., Fitzgerald P., Ross P., Stanton C., Clarke G., Cryan J.F., Dinan T.G. // *J. Psychiat. Res.* 2016. T. 82. P. 109–118.
32. McBurney M.I., Davis C., Fraser C.M., Schneeman B.O., Huttenhower C., Verbeke K., Walter J., Latulippe M.E. // *J. Nutr.* 2019. T. 149. № 11. P. 1882–1895.
33. Bastiaanssen T.F.S., Quinn T.P., Loughman A. // *Nat. Ment. Health.* 2023. T. 1. P. 930–938.
34. Zhang Y., Zhang J., Wu J., Zhu Q., Chen C., Li Y. // *Front. Microbiol.* 2023. T. 14. 1124454.
35. Knight R., Vrbanc A., Taylor B.C., Aksenov A., Callewaert C., Debelius J., Gonzalez A., Kosciolk T., McCall L.-I., McDonald D., Melnik A.V., Morton J.T., Navas J., Quinn R.A., Sanders J.G., Swafford A.D., Thompson L.R., Tripathi A., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Qiyun Zhu, Caporaso J.G., Dorrestein P.C. // *Nat Rev Microbiol.* 2018. T. 16. P. 410–422.
36. Geng S., Yang L., Cheng F., Zhang Z., Li J., Liu W., Li Y., Chen Y., Bao Y., Chen L., Fei Z., Li X., Hou J., Lin Y., Liu Z., Zhang S., Wang H., Zhang Q., Wang H., Wang X., Zhang J. // *Front. Microbiol.* 2020. T. 10. 3067.

37. Meng C., Feng S., Hao Z., Dong C., Liu H. // PLoS One. 2020. T. 17. № 3. e0265430.
38. Shevchenko A., Shalaginova I., Katserov D., Matskova L., Shiryayeva N., Dyuzhikova N. // PloS One. 2023. T. 18. № 12. e0295709.
39. Long-Smith C., O’Riordan K.J., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2020 T. 6. № 60. P. 477–502.
40. Olavarria-Ramirez L., Cooney-Quane J., Murphy G., McCafferty C.P., Cryan J.F., Dockray S. // Neurosci. & Biobehav. Rev. 2023. T. 145. 105013.
41. Voikar V., Gaburro S., Meyer N. // Front. Behav. Neurosci. 2020. T. 14. 575434.
42. Vandeputte D., Kathagen G., D’hoel K., Vieira-Silva S., Valles-Colomer M., Sabino J., Wang J., Tito R.Y., De Commer L., Darzi Y., Vermeire S., Falony G., Raes J. // Nat. 2017. T. 551. P. 507–511.
43. Louca S., Doebeili M., Parfrey L.W. // Microb. T. 6. № 1. 41.
44. Zemb O., Achard C.S., Hamelin J., De Almeida M.L., Gabinaud B., Cauquil L., Verschuren L.M.G., Godon J.J. // Microbiol-open. 2020. T. 9. № 3. e977.

Gut Microbiota as a Modulator of Post-Stress Neuroinflammation: Methodological Limitations of Existing Research Practices

I. G. Shalaginova¹, S. P. Luzikova¹, A. E. Vylegzhanina^{1, 2}, and D. S. Katserov¹

¹Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

²Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

According to the current hypothesis, gut microbiota has a significant impact on the central nervous system and behavior through various mechanisms, including modulation of the immune system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis), epigenetic regulation of gene expression, and production of metabolites. The gut-brain axis is one of the key targets for research into the mechanisms of Alzheimer’s disease, pathological anxiety, mood disorders, and autism. It is suggested that post-stress neuroinflammation, which may be related to changes in the microbiota, plays a role in the development of these pathologies. However, the discovered “dysbiotic patterns” in the microbiomes of animal models under different stress models and in patients suffering from psychopathologies are not specific and may be secondary to the disease. The lack of understanding of the mechanisms by which gut microbiota is involved in the pathogenesis of neuro- and psychopathologies hinders the translation of results obtained from animal models. The review discusses the main methodological problems of research on the “gut-brain axis” and explores ways to address them.

Keywords: gut-brain axis, gut microbiota, neuroinflammation, stress, psychopathologies

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 612.452 + 612.463.8

АКТИВАЦИЯ СИМПАТОАДРЕНАЛОВОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ МИМЕТИКА ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА-1 У КРЫС

© 2024 г. Е. В. Балботкина¹, А. С. Марина¹, А. В. Кутина^{1, *}

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

*E-mail: kutina_anna@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2024 г.

После доработки 24.07.2024 г.

Принята к публикации 09.08.2024 г.

Глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1) — основной инкретин, обеспечивающий секрецию инсулина и нормализацию гликемии после приема пищи. Миметики ГПП-1 используются для терапии сахарного диабета 2 типа и ожирения. Помимо инсулинотропного действия у ГПП-1 и его миметиков выявлены эффекты на функции сердечно-сосудистой и эндокринной систем, центральные механизмы регуляции аппетита и метаболизма, ионорегулирующую и осморегулирующую функции почек, а также обнаружено парадоксальное гипергликемическое действие инкретиномиметиков. В представленной работе исследованы механизмы участия симпатoadреналовой системы в развитии гипергликемического и натрийуретического эффектов миметика ГПП-1 эксенатида у крыс. В экспериментах на здоровых крысах показано, что ГПП-1 и его миметик эксенатид усиливают экскрецию ионов натрия почками. У эксенатида в дозах 0.15–5 нмоль/кг, но не у ГПП-1 (1.5 нмоль/кг), выявлено гипергликемическое действие (глюкоза крови повышалась до 7.2–9.1 мМ в течение первого часа). Показано, что рост уровня глюкозы в крови при введении инкретиномиметика ассоциирован с ростом экскреции почками метаболитов катехоламинов, задерживается при предварительном введении ганглиоблокатора (пентамин 30 мг/кг) и значительно нивелируется неселективным β- и селективным β₂-адреноблокаторами (пропранолол 5 мг/кг, ICI-118551 1 мг/кг). Выявлена значимая модуляция натрийуреза в ответ на введение эксенатида при блокаде различных подтипов адренорецепторов. α₁- и α₂-адреноблокаторы существенно уменьшают (на 80%), а β₁- и β₂-адреноблокаторы повышают (на 150%) экскрецию натрия почками при действии эксенатида. Таким образом, получены данные об активации инкретиномиметиком симпатoadреналовой системы, которая модулирует направленность и выраженность эффектов эксенатида на уровень глюкозы в крови и экскрецию натрия почками у здоровых животных. Потенциальное влияние на симпатoadреналовую систему важно учитывать для оценки рисков развития неблагоприятных побочных эффектов при терапии инкретиномиметиками.

Ключевые слова: эксенатид, глюкагоноподобный пептид-1, адреналин, норадреналин, гликемия, натрийурез, адренорецепторы, ганглиоблокатор

DOI: 10.31857/S1027813324040066, **EDN:** ЕНАТРО

Список использованных сокращений:

ГПП-1 — глюкагоноподобный пептид-1

ДПП-4 — дипептидилпептидаза-4

ВВЕДЕНИЕ

Глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1) является основным инкретином, гормоном, секретруемым L-клетками подвздошной кишки и вызывающим глюкозозависимую секрецию инсулина и нормализацию постпрандиального уровня гликемии [1]. Миметики или агонисты рецепторов ГПП-1 (инкретиномиметики) и ингибиторы фермента, расщепляющего ГПП-1 (ингибиторы

дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4)), все шире внедряются в клиническую практику для лечения пациентов с сахарным диабетом 2 типа и ожирением [2]. Наряду с основным действием на углеводный обмен, аппетит и потребление пищи ГПП-1 и его миметики оказывают кардио- и нейропротективное действие, влияя на водно-солевой обмен и функции почек, на метаболизм костей и развитие остеопороза и т.д. [3]. В нашей лаборатории, а также в ряде работ других авторов была выявлена парадоксальная способность миметиков ГПП-1 (эксенатид [4–5], лираглутид [6]) повышать уровень глюкозы в крови у здоровых крыс, что может быть обусловлено активацией симпатической

нервной системы и надпочечников. Показано, что гипергликемический эффект эксенатида ингибируется антагонистом рецептора ГПП-1 [4–5], устраняется введением гексаметония (ганглиоблокатор) и гуанетидина (истощает запас норадреналина в адренэргических окончаниях) [6] и отсутствует у крыс после адреналэктомии [4]. Известно, что катехоламины, высвобождающиеся из симпатических нервных окончаний в тканях и секретируемые мозговым веществом надпочечников в кровь, вовлечены в регуляцию секреции инсулина и глюкагона поджелудочной железой, потребления глюкозы скелетными мышцами и жировой тканью, гликогенолиза и глюконеогенеза в печени. Эти многочисленные эффекты катехоламинов опосредуются различными подтипами адренорецепторов. При высоких уровнях циркулирующих катехоламинов развивается нарушение толерантности к глюкозе и гипергликемия [7]. Исследований, посвященных вкладу отдельных подтипов адренорецепторов в реализацию гипергликемического эффекта миметиков ГПП-1, не проводилось. Определение механизмов парадоксального гипергликемического ответа на инкретиномиметики является важным для понимания вовлечения ГПП-1 в регуляцию симпатoadреналовой системы, а также для оценки рисков развития неблагоприятных побочных эффектов при терапии инкретиномиметиками и ингибиторами деградации ГПП-1.

Ранее в нашей лаборатории было показано и детально исследовано натрийуретическое действие ГПП-1 и его миметиков [8–9]. Показано, что основным механизмом натрийуреза при действии ГПП-1 и его миметиков является угнетение реабсорбции натрия в проксимальном отделе нефрона [10–11]. Остается открытым вопрос о модуляции натрийуретического эффекта миметиков ГПП-1 при сопутствующей активации симпатoadреналовой системы.

Цель работы — исследование механизмов участия симпатoadреналовой системы в развитии гипергликемического и натрийуретического эффектов миметика ГПП-1 эксенатида у крыс. В задачи работы входили оценка эффектов эксенатида и ГПП-1 на уровень глюкозы капиллярной крови и на экскрецию ионов натрия почками, анализ экскреции с мочой метаболитов адреналина и норадреналина при действии эксенатида у крыс, исследование эффектов различных адреноблокаторов и ганглиоблокатора на уровень глюкозы в крови и экскрецию ионов натрия почками у крыс после введения эксенатида.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 60 самках крыс Вистар в возрасте 2–3 мес. Животные были получены из экспериментально-биологической

клиники ИЭФБ РАН. В виварии животные содержались при стандартном световом (12/12 часов) и температурном режимах в клетках по 5 особей и получали гранулированный корм для грызунов (ООО “Аллер Петфуд”, Россия) и воду *ad libitum*. Во всех экспериментах животные участвовали натощак, для чего их за 10 часов до опыта лишали корма при сохранении свободного доступа к воде. До проведения основных серий экспериментов крыс адаптировали к экспериментальным условиям и клеткам для сбора мочи.

Основные серии экспериментов:

1. Исследование эффектов эксенатида (Баета®, Eli Lilly, США), вводимого внутримышечно в дозах 0.05, 0.15, 0.5, 1.5 и 5 нмоль/кг, на уровень глюкозы капиллярной крови (через 30 мин) и экскрецию ионов натрия почками за 2 часа.

2. Оценка экскреции с мочой метаболитов адреналина и норадреналина в контрольной группе и при действии эксенатида в дозах 0.5 и 1.5 нмоль/кг. В пробирку для сбора мочи добавляли 6Н HCl из расчета 10 мкл на 1 мл пробы в качестве консерванта.

3. Исследование эффектов адреноблокаторов и ганглиоблокатора на уровень глюкозы в крови и экскрецию ионов натрия почками у крыс после введения эксенатида.

Ганглиоблокатор пентамин (ОАО “Дальхимфарм”, Россия) в дозе 30 мг/кг и адреноблокаторы (табл. 1) вводили внутривентриально в объеме 1 мл/кг за 30 мин до инъекции эксенатида в дозах 0.5 или 5 нмоль/кг внутримышечно. Дозы адреноблокаторов были подобраны на основании данных литературы [12–13] и предварительных пилотных исследований в нашей лаборатории.

4. Исследование эффектов ГПП-1 на уровень глюкозы капиллярной крови (через 30 мин) и экскрецию ионов натрия почками за 2 часа.

ГПП-1 (Bachem, США) вводили внутривентриально в дозе 1.5 нмоль/кг с или без предварительного введения ингибитора ДПП-4 вилдаглиптина (Matrix Scientific, США) в дозе 1 мг/кг внутривентриально за 30 мин до ГПП-1 [14].

Эксперименты на животных проводили 1 раз в неделю в течение 1.5 мес. Рандомизация на группы проводилась в начале каждой недели. Общая схема экспериментальных групп представлена на рис. 1. Утром крыс забирали из вивария и после введения им препаратов в соответствии со схемой экспериментов помещали на 2 или 4 часа в индивидуальные клетки-пеналы с проволочным дном и мерной пробиркой для сбора мочи. Уровень глюкозы определяли глюкометром AccuChek Performa Nano (Roche Diagnostics, Германия) через 30 мин после инъекции ГПП-1 или эксенатида в капле капиллярной крови, полученной из кончика хвоста. Во время эксперимента крысы

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подтвержден парадоксальный гипергликемический эффект инкретиномиметика и выявлен диапазон доз, в котором он проявляется. Эксенатид в дозах от 0.15 нмоль/кг и выше вызывал статистически значимый рост уровня глюкозы крови (рис. 2). Через 30 мин после инъекции эксенатида в дозах 0.5–5 нмоль/кг концентрация глюкозы в крови достигала 8.4 (7.4; 8.9) мМ. Экскреция ионов натрия с мочой возросла после введения миметика ГПП-1 в дозах от 0.15 нмоль до 5 нмоль/кг.

Эксенатид в дозе 0.5 нмоль/кг вызывал максимальный натрийурез, далее кривая дозозависимости выходила на плато (рис. 2)

В отличие от эксенатида сам инкретин ГПП-1 в дозе 1.5 нмоль/кг не оказывал влияния на уровень глюкозы в крови животных (рис. 3). Концентрация глюкозы крови не отличалась от таковой в контрольной группе как при инъекции ГПП-1, так и при совместном введении ГПП-1 с ингибитором ДПП-4. Наблюдался рост экскреции ионов натрия почками при действии ГПП-1 совместно с вилдаглиптином.

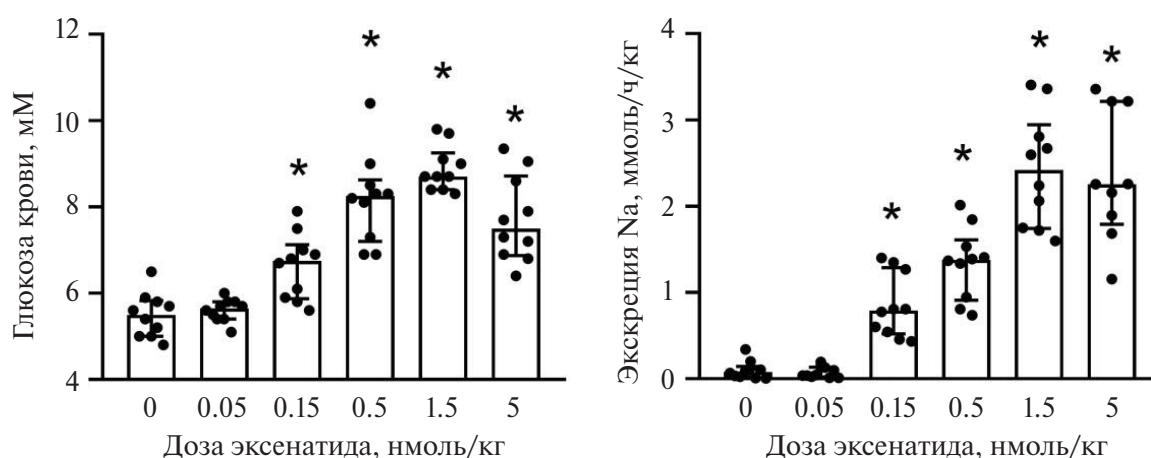


Рис. 2. Концентрация глюкозы в крови и экскреция ионов натрия с мочой у крыс после введения эксенатида в различных дозах.

Здесь и на рис. 3–9 данные представлены в виде медианы и межквартильных размахов, здесь и на рис. 3–6 и 8–9 точками показаны отдельные наблюдения.

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (0 нмоль/кг), критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на 5 сравнений.

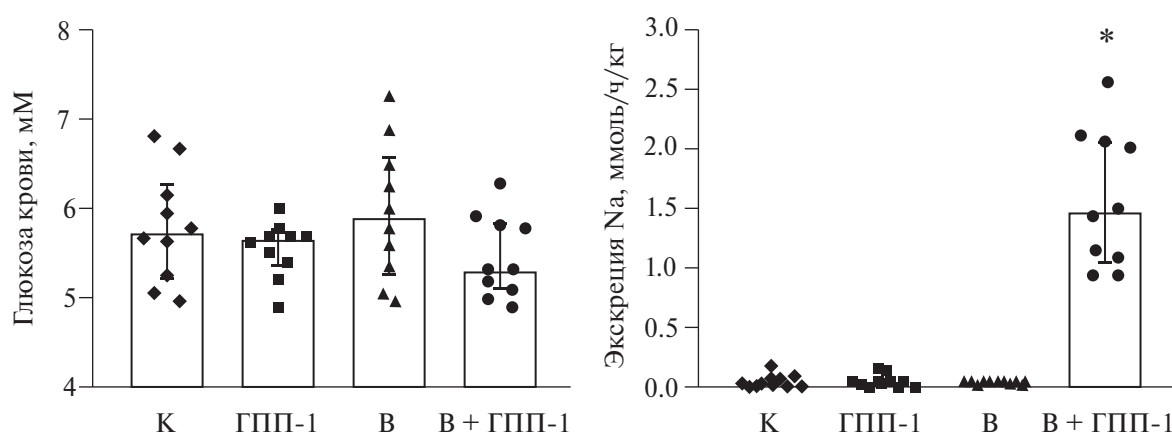


Рис. 3. Концентрация глюкозы в крови и экскреция ионов натрия с мочой у крыс после введения ГПП-1, вилдаглиптина, ГПП-1 + вилдаглиптина.

К – контроль (0.9% раствор NaCl внутрибрюшинно 1 мл/кг), В – вилдаглиптин (1 мг/кг), ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид-1 (1.5 нмоль/кг).

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на 3 сравнения.

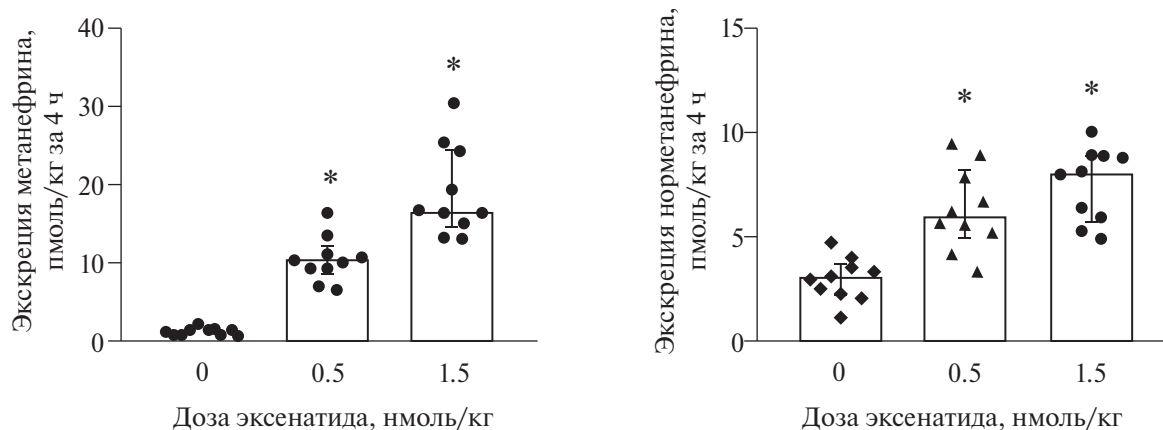


Рис. 4. Экскреция метаболитов адреналина и норадреналина с мочой у крыс после введения эксенатида.

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (0 нмоль/кг), критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на 2 сравнения.

Натрийурез был сопоставим по величине с эффектом высоких доз эксенатида (рис. 3).

Для проверки гипотезы об активации симпатoadреналовой системы в ответ на введение миметика ГПП-1 была оценена экскреция метаболитов адреналина и норадреналина с мочой. Введение эксенатида в дозах 0.5 и 1.5 нмоль/кг дозозависимо увеличивало экскрецию почками метанефрина в 9 и 17 раз, а норметанефрина в 2 и 2.5 раза (рис. 4), что свидетельствует о повышении уровня катехоламинов в крови у животных.

Было предположено, что основным источником катехоламинов при действии эксенатида является мозговое вещество надпочечников, и проведена

серия экспериментов с предварительным введением животным ганглиоблокатора пентамина. Пентамин является антагонистом Н-холинорецепторов в вегетативных ганглиях и должен блокировать передачу сигнала с преганглионарных на постганглионарные волокна, а также на хромафинные клетки мозгового вещества надпочечников. Предварительное введение пентамина задержало рост гликемии в ответ на инкретиномиметик: через 30 мин после введения эксенатида в дозах 0.5 и 5 нмоль/кг концентрация глюкозы в крови была значимо ниже, чем у животных, которым вводили только эксенатид (рис. 5). Введение ганглиоблокатора без эксенатида не влияло на уровень глюкозы в крови (рис. 5).

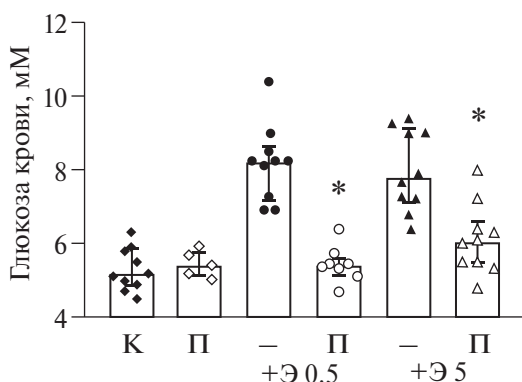


Рис. 5. Влияние ганглиоблокатора пентамина на развитие гипергликемии у крыс после введения эксенатида.

К – контроль (вода для инъекций внутривенно 1 мл/кг + 0.9% раствор NaCl внутримышечно 1 мл/кг), П – пентамин (30 мг/кг), Э 0.5 и Э 5 – эксенатид (0.5 и 5 нмоль/кг).

* – статистически значимые различия по сравнению с соответствующей группой без введения пентамина, критерий Манна-Уитни.

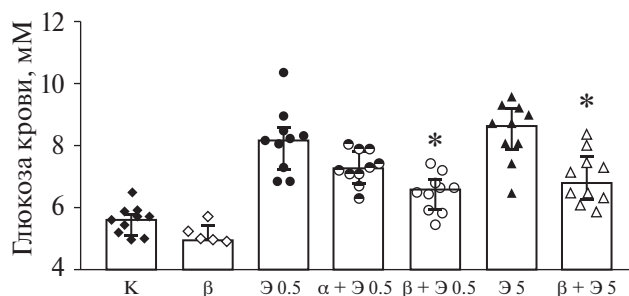


Рис. 6. Влияние неселективных α- и β-адреноблокаторов на концентрацию глюкозы в крови у крыс. К – контроль (вода для инъекций внутривенно 1 мл/кг + 0.9% раствор NaCl внутримышечно 1 мл/кг), Э 0.5 и Э 5 – эксенатид (0.5 и 5 нмоль/кг), β – неселективный β-адреноблокатор пропранолол в дозе 5 мг/кг, α – неселективный α-адреноблокатор фентоламин в дозе 1 мг/кг.

* – статистически значимые различия по сравнению с соответствующей группой без введения адреноблокаторов, критерий Манна-Уитни без или с поправкой Бонферрони на 2 сравнения.

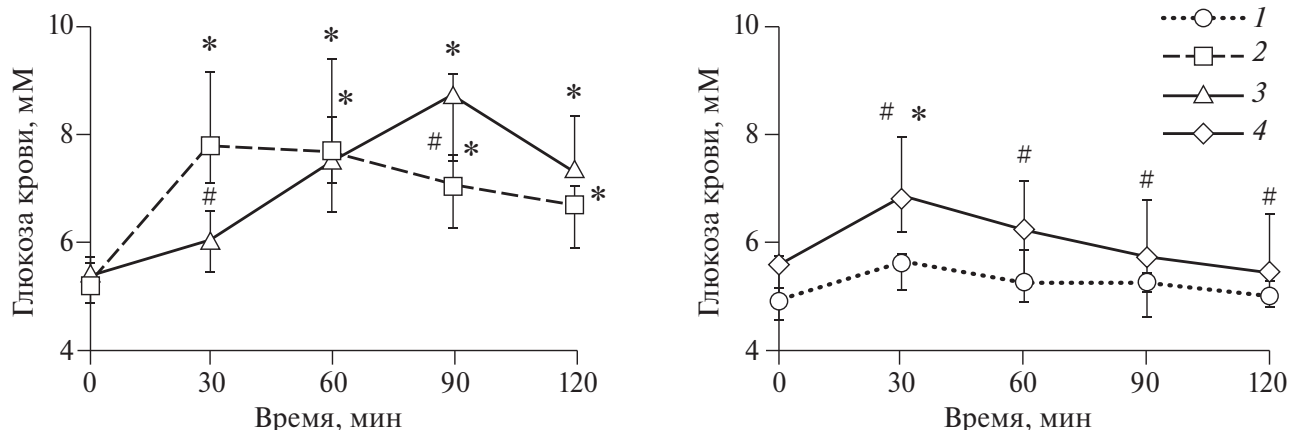


Рис. 7. Динамика концентрации глюкозы в крови в течение 2 часов после введения эксенатида в дозе 5 нмоль/кг. 1 – контроль (вода для инъекций внутривенно 1 мл/кг + 0.9% раствор NaCl внутримышечно 1 мл/кг), 2 – эксенатид, 3 – пентамин + эксенатид, 4 – пропранолол + эксенатид. Статистически значимые различия ($p < 0.05$): * – по сравнению с контролем, # – по сравнению с эксенатидом 5 нмоль/кг, критерий Манна-Уитни с поправкой на 6 сравнений.

Для анализа механизма гипергликемии при действии эксенатида был использован ряд неселективных и селективных адreno-блокаторов. Неселективный α -адreno-блокатор фентоламин не препятствовал повышению концентрации глюкозы в крови, в то время как неселективный β -блокатор

пропранолол снижал прирост уровня гликемии в ответ на инъекцию миметика ГПП-1 (рис. 6). Про-пранолол уменьшал гипергликемию вызванную как низкой (0.5 нмоль/кг), так и высокой (5 нмоль/кг) дозой эксенатида (рис. 6). Введение пропранолола без эксенатида не влияло на уровень глюкозы в крови (рис. 6).

Характер действия пентамина и пропранолола на уровень гликемии после инъекции эксенатида был проанализирован в динамике на

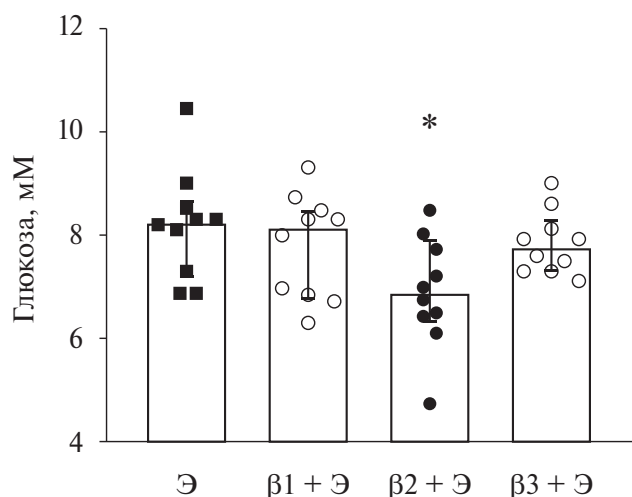


Рис. 8. Концентрация глюкозы в крови у крыс в ответ на эксенатид после предварительного введения блокаторов отдельных подтипов β -адreno-рецепторов. Э – эксенатид (0.5 нмоль/кг), β_1 – атенолол (2 мг/кг), β_2 – ICI-11855 (1 мг/кг), β_3 – L-748337 (1 мг/кг). В группе без антагонистов для контроля вводили воду для инъекций внутривенно 1 мл/кг ($n = 5$) или 5% водный раствор ДМСО внутривенно 1 мл/кг ($n = 5$). * – статистически значимые различия по сравнению с группой без введения адreno-блокаторов, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на 3 сравнения.

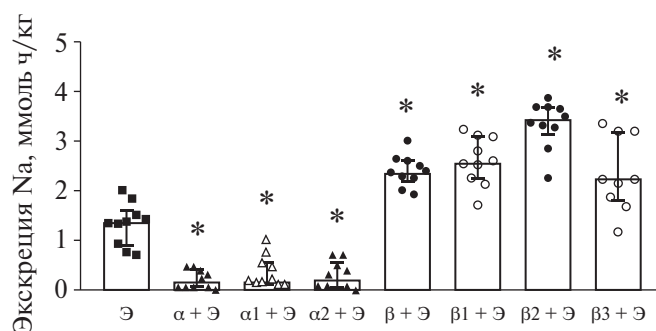


Рис. 9. Экскреция ионов натрия у крыс после введения эксенатида на фоне предварительной блокады адreno-рецепторов. Э – эксенатид (0.5 нмоль/кг), α – фентоламин (1 мг/кг), α_1 – доксазозин (1 мг/кг), α_2 – раувольсцин (1 мг/кг), β – пропранолол (5 мг/кг), β_1 – атенолол (2 мг/кг), β_2 – ICI-11855 (1 мг/кг), β_3 – L-748337 (1 мг/кг). В группе без антагонистов для контроля вводили воду для инъекций внутривенно 1 мл/кг ($n = 5$) или 5% водный раствор ДМСО внутривенно 1 мл/кг ($n = 5$). * – статистически значимые различия по сравнению с группой без введения адreno-блокаторов, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на 7 сравнений.

протяжении 2 часов. После введения эксенатида в дозе 5 нмоль/кг гипергликемия достигала максимума 7.7 (7.2; 9.1) мМ к 30 мин эксперимента и сохранялась на протяжении 2 часов, постепенно снижаясь до значений в контроле (рис. 7). Предварительное (за 30 мин до инкретиномиметика) внутрибрюшинное введение животным ганглиоблокатора пентамина в дозе 30 мг/кг на 30 минут задерживало развитие эксенатид-стимулированной гипергликемии (рис. 7), рост концентрации глюкозы в крови у крыс в этом случае наблюдался с 60 минуты и достигал максимума 8.8 (7.5; 8.9) мМ на 90 минуте наблюдения (рис. 7). Неселективный β -блокатор пропранолол вызывал статистически значимое снижение эксенатид-стимулированной гипергликемии на протяжении всего периода наблюдения, т.е. в течение 2 часов (рис. 7).

Использование селективных β -блокаторов показало, что наиболее значимое снижение эксенатид-индуцированной гипергликемии наблюдалось при введении β_2 -адреноблокатора (ICI-11855). β_1 -адреноблокатор (атенолол) и β_3 -адреноблокатор (L-748337) не препятствовали повышению концентрации глюкозы в крови в ответ на введение эксенатида в дозе 0.5 нмоль/кг (рис. 8).

Выявлена существенная модуляция натрийуретического ответа почки на эксенатид при блокаде различных подтипов адренорецепторов. При предварительной блокаде α -адренорецепторов экскреция ионов натрия почками была значительно меньше, а при блокаде β -адренорецепторов выше, чем при действии эксенатида без введения адреноблокаторов (рис. 9). Наиболее выраженный натрийурез отмечался при введении эксенатида на фоне селективного антагониста β_2 -адренорецептора.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе было выявлено гипергликемическое действие инкретиномиметика эксенатида в диапазоне доз 0.15–5 нмоль/кг у здоровых крыс. Показано, что рост концентрации глюкозы в крови ассоциирован с ростом экскреции почками метаболитов катехоламинов. Предварительное введение ганглиоблокатора задерживает рост концентрации глюкозы в крови в ответ на эксенатид, а инъекция неселективного β - или селективного β_2 -адреноблокатора значительно нивелирует гипергликемический эффект инкретиномиметика.

Гипергликемия у крыс наблюдалась нами только в ответ на инъекцию инкретиномиметика эксенатида, но не на сам ГПП-1. Аналогичные данные были получены в работе Pérez-Tilve et al. [4]. Различия в эффектах эксенатида и ГПП-1 могут быть обусловлены существенными различиями в химической структуре [15] и сродстве к рецепторам, в продолжительности циркуляции в системном кровотоке [5] и длительности физиологического

действия этих пептидов. Проведенные эксперименты с введением ГПП-1 совместно с ингибитором ДПП-4 показывают, что при создании условий для пролонгированной циркуляции ГПП-1 в крови выявляется натрийуретическое действие гормона, но уровень глюкозы крови остается на контрольном уровне, т.е., по-видимому, различия в длительности действия не являются определяющими для активации симпатoadреналовой системы. В ряде работ было показано, что при центральном введении ГПП-1 вызывает активацию системы гипоталамус-гипофиз-надпочечник, вегетативных центров гипоталамуса и ствола головного мозга, активирует экспрессию тирозингидроксилазы в катехоламинэргических нейронах ствола головного мозга [16–17], вызывает повышение в крови уровня АКТГ, кортикостерона, альдостерона, адреналина и норадреналина [18]. Перечисленные выше эффекты центрального (внутрижелудочкового) введения ГПП-1 воспроизводятся при периферическом введении (подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно) миметиков ГПП-1 в терапевтическом диапазоне доз [5, 17, 19–22]. Кроме того, выявлена экспрессия рецепторов ГПП-1 в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников и описаны прямые влияния ГПП-1 и эксенатида на экзцитотоз нейромедиаторов [23].

Описано, что в отличие от самого ГПП-1 его миметики могут вызывать рост артериального давления и частоты сердечных сокращений [16, 24]. Эти эффекты на сердечнососудистую систему ассоциированы с активацией нейронов в мозговом веществе надпочечников и нейронов в вегетативных ядрах головного мозга у крыс, включая катехоламинэргические нейроны продолговатого мозга, блокируются антагонистом ГПП-1 рецепторов, не проявляются у животных после адреналэктомии [16, 24].

Принципиально важным является ответ на вопрос, оказывают ли инкретиномиметики аналогичное влияние на симпатoadреналовую систему у человека, как это показано для крыс. Основная часть работ, посвященная изучению инкретиномиметиков, выполнена на пациентах с сахарным диабетом и ожирением. У здоровых добровольцев было выявлено развитие парадоксальной гипергликемии при физической нагрузке на фоне предварительного введения эксенатида, в состоянии покоя такого эффекта у человека не наблюдали [25]. Учитывая широкое внедрение инкретиномиметиков в клиническую практику для лечения сахарного диабета, ожирения и других эндокринных и не эндокринных патологий, важно изучение потенциальных контринсулярных эффектов препаратов у человека.

Физиологические последствия повышенного выброса катехоламинов наиболее подробно изучены при феохромоцитоме. Показано, что

катехоламины часто приводят к нарушению толерантности к глюкозе. Механизм включает как нарушение секреции инсулина, так и повышение инсулинорезистентности (стимуляция выброса глюкагона, активация гликогенолиза и глюконеогенеза) [7]. Вероятно, последний механизм в нашем случае является ведущим, так как предотвращение выброса катехоламинов при использовании ганглиоблокатора и блокада $\beta 2$ -адренорецепторов в наибольшей степени препятствовали росту концентрации глюкозы в крови при введении высоких доз эксенатида. Таким образом, развитие гипергликемии после введения эксенатида опосредованно выбросом катехоламинов и их влиянием на $\beta 2$ -адренорецепторы, что согласуется с данными о $\beta 2$ -адренергической стимуляции процессов гликогенолиза и глюконеогенеза в печени [7].

Ранее было показано, что у крыс с ожирением диуретическое и натрийуретическое действие эксенатида снижено и восстанавливается при абляции почечных симпатических нервов [26]. Важным представляется вопрос о роли активации симпатoadреналовой системы в механизме натрийуретического действия инкретиномиметиков. Нами показано, что ГПП-1 в отличие от эксенатида оказывает натрийуретическое, но не гипергликемическое действие. Поэтому более вероятно, что механизм натрийуреза, вызванного ГПП-1 и его миметиками, связан с их прямым действием в почке (опосредованное рецепторами ГПП-1 снижение канальцевой реабсорбции натрия), а не с активацией симпатoadреналовой системы. В то же время нами выявлена значимая модуляция натрийуреза в ответ на введение эксенатида при блокаде различных подтипов адренорецепторов. $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -адреноблокаторы существенно уменьшали (на 80%), а $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адреноблокаторы повышали (на 150%) экскрецию натрия почками при действии эксенатида. $\beta 1$ -адренорецепторы расположены преимущественно в толстом восходящем отделе петли Генле, а $\beta 2$ -адренорецепторы обнаружены в проксимальных канальцах нефрона [27] и собирательных трубках [28]. Известно, что возможно усиление реабсорбции натрия при активации синаптических $\beta 1$ -адренорецепторов и внесинаптических $\beta 2$ -адренорецепторов в почке. Повышенный уровень катехоламинов, вероятно, частично ограничивает потерю натрия почками при действии эксенатида. Блокада β -адренорецепторов в условиях стимуляции секреции катехоламинов эксенатидом вызывает увеличение экскреции ионов натрия в связи с уменьшением реабсорбции в указанных отделах; противоположный эффект оказывает блокада α -адренорецепторов. Модулирующее влияние α -адренорецепторов ранее отмечалось при действии диуретиков, а у пациентов с артериальной гипертензией показано, что $\alpha 1$ -адреноблокаторы могут способствовать задержке натрия в организме [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены данные об активации инкретиномиметиком симпатoadреналовой системы, которая модулирует направленность и выраженность эффектов эксенатида на уровень глюкозы в крови и экскрецию натрия почками у здоровых животных. Потенциальное влияние на симпатoadреналовую систему важно учитывать для оценки рисков развития неблагоприятных побочных эффектов при терапии инкретиномиметиками.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Этическое одобрение. Исследования с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, требованиями и рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных и были одобрены на заседании комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 2-1/2024 заседания № 2 от 29.02.2024 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huber H., Schieren A., Holst J.J., Simon M.C. // Am. J. Clin. Nutr. 2024. V. 119. N 3. P. 599–627. doi: 10.1016/j.ajcnut.2024.01.007.
2. Liakos A., Karagiannis T., Avgerinos I., Malandris K., Tsapas A., Bekiari E. // Hormones (Athens). 2023. V. 22. № 4. P. 677–684. doi: 10.1007/s42000-023-00488-w.
3. Brown E., Heerspink H.J.L., Cuthbertson D.J., Wilding J.P.H. // Lancet. 2021. V. 398. № 10296. P. 262–276. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00536-5.
4. Pérez-Tilve D., González-Matías L., Aulinger B.A., Alvarez-Crespo M., Gil-Lozano M., Alvarez E., Andrade-Olivie A.M., Tschöp M.H., D'Alessio D.A., Mallo F. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2010. V. 298. № 5. P. E1088–E1096. doi: 10.1152/ajpendo.00464.2009.
5. Wen S., Nguyen T., Gong M., Yuan X., Wang C., Jin J., Zhou L. // Diabetes. Metab. Syndr. Obes. 2021. V. 14. P. 2955–2972. doi: 10.2147/DMSO.S312527.
6. Hsu C.C., Cheng J.T., Hsu P.H., Li Y., Cheng K.C. // Pharmaceuticals (Basel). 2022. V. 15. № 7. P. 904. doi: 10.3390/ph15070904.

7. *Abe I., Islam F., Lam A.K.* // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2020. V. 11. P. 593780. doi: 10.3389/fendo.2020.593780.
8. *Kutina A.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Yu.V.* // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2013. V. 40. № 8. P. 510–517.
9. *Kutina A.V., Golosova D.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V.* // *J. Neuroendocrinol.* 2016. V. 28. № 4. P. 1–8. doi: 10.1111/jne.12367.
10. *Marina A.S., Kutina A.V., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V.* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. № 4. P. 436–440. doi: 10.1007/s10517-017-3634-0.
11. *Каравашкина Т.А., Балботкина Е.В., Савина Ю.А., Кутина А.В.* // *Эксп. Клинич. Фармакол.* 2020. Т. 83. № 2. С. 17–22. doi: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-17-22.
12. *Hallberg H., Almgren O., Svensson T.H.* // *Psychopharmacology (Berl)*. 1982. V. 76. № 2. P. 114–117. doi: 10.1007/BF00435263.
13. *Zarrindast M.R., Fazli-Tabaei S., Semnani S., Fathollah Y., Yahyavi S.H.* // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000. V. 65. № 2. P. 275–279. doi: 10.1016/s0091-3057(99)00198-7.
14. *Балботкина Е.В., Спириденко Е.А., Каравашкина Т.А., Кутина А.В.* // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019. Т. 63. № 3. С. 73–80.
15. *Clark L.* // *JAAPA*. 2024. V. 37. № 4. P. 1–4. doi: 10.1097/01.JAA.0001007388.97793.41.
16. *Yamamoto H., Lee C.E., Marcus J.N., Williams T.D., Overton J.M., Lopez M.E., Hollenberg A.N., Baggio L., Saper C.B., Drucker D.J., Elmquist J.K.* // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 110. № 1. P. 43–52. doi: 10.1172/JCI15595.
17. *Yamamoto H., Kishi T., Lee C.E., Choi B.J., Fang H., Hollenberg A.N., Drucker D.J., Elmquist J.K.* // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 7. P. 2939–2946. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-07-02939.2003.
18. *Arai J., Okada S., Yamaguchi-Shima N., Shimizu T., Sasaki T., Yorimitsu M., Wakiguchi H., Yokotani K.* // *Clin Exp Pharmacol. Physiol.* 2008. V. 35. № 8. P. 965–970. doi: 10.1111/j.1440-1681.2008.04957.x.
19. *Malendowicz L.K., Nussdorfer G.G., Nowak K.W., Ziolkowska A., Tortorella C., Trejter M.* // *Int. J. Mol. Med.* 2003. V. 12. № 2. P. 237–241.
20. *Baraboi E.D., St-Pierre D.H., Shooner J., Timofeeva E., Richard D.* // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. V. 301. № 4. P. R1011–R1024. doi: 10.1152/ajpregu.00424.2010.
21. *Gil-Lozano M., Romaní-Pérez M., Outeiriño-Iglesias V., Vigo E., Brubaker P.L., González-Matías L.C., Mallo F.* // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013. V. 304. № 10. P. 1105–1117. doi: 10.1152/ajpendo.00529.2012.
22. *Diz-Chaves Y., Gil-Lozano M., Toba L., Fandiño J., Ogando H., González-Matías L.C., Mallo F.* // *J. Endocrinol.* 2016. V. 230. № 2. P. R77–R94. doi: 10.1530/JOE-16-0118.
23. *González-Santana A., Estévez-Herrera J., Seward E.P., Borges R., Machado J.D.* // *Cell Rep.* 2021. V. 36. № 8. P. 09609. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109609.
24. *Barragán J.M., Rodríguez R.E., Eng J., Blázquez E.* // *Regul. Pept.* 1996. V. 67. № 1. P. 63–68. doi: 10.1016/s0167-0115(96)00113-9.
25. *Khoo E.Y., Wallis J., Tsintzas K., Macdonald I.A., Mansell P.* // *Diabetologia*. 2010. V. 53. № 1. P. 139–143. doi: 10.1007/s00125-009-1579-1.
26. *Liu X., Patel K.P., Zheng H.* // *J. Am. Heart Assoc.* 2021. V. 10. № 21. P. e022542. doi: 10.1161/JAHA.121.022542.
27. *Arif E., Nihalani D.* // *Nephrology (Carlton)*. 2019. V. 24. № 5. P. 497–503. doi: 10.1111/nep.13584. PMID: 30848004.
28. *Morla L., Edwards A., Crambert G.* // *World J. Biol. Chem.* 2016. V. 7. № 1. P. 44–63. doi: 10.4331/wjbc.v7.i1.44.
29. *Bryson C.L., Psaty B.M.* // *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* 2002. V. 3. № 1. P. 7. doi: 10.1186/1468-6708-3-7.

Activation of the Sympathoadrenal System under the Influence of Glucagon-Like Peptide-1 Mimetic in Rats

E. V. Balbotkina¹, A. S. Marina¹, and A. V. Kutina¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is the main incretin that ensures insulin secretion and normalization of postprandial glycemia. GLP-1 mimetics are used for treatment of type 2 diabetes mellitus and obesity. Besides the insulinotropic effect, GLP-1 and its mimetics have been shown to affect on the functions of the cardiovascular and endocrine systems, the central mechanisms of appetite and metabolism regulation, the ion-regulatory and osmoregulatory renal functions, and a paradoxical hyperglycemic effect of incretin mimetics was also discovered. In current work the mechanisms by which the sympathoadrenal system is involved in the development of hyperglycemic and natriuretic effects of the GLP-1 mimetic exenatide in rats were studied. Experiments with healthy rats revealed that GLP-1 and its mimetic exenatide augmented the renal sodium excretion. Exenatide at doses of 0.15–5 nmol/kg, but not GLP-1 (1.5 nmol/kg), showed a hyperglycemic effect (blood glucose increased to 7.2–9.1 mM during the first hour). It has been shown that the rise of blood glucose level in rats administrated with incretin mimetic was associated with increase in renal excretion of catecholamine metabolites, was delayed by preliminary injection of a ganglionic blocker (pentamine 30 mg/kg) and was considerably leveled by non-selective β - and selective β_2 -adrenergic blockers (propranolol 5 mg/kg, ICI-118551 1 mg/kg). A significant modulation of natriuresis was revealed in response to the administration of exenatide during blockade of various adrenergic receptors subtypes. α_1 - and α_2 -blockers appreciably reduced (by 80%), and β_1 - and β_2 -blockers increased (by 150%) exenatide-stimulated renal sodium excretion. Thus, the data obtained indicate on the exenatide-induced activation of the sympathoadrenal system, which modulates the direction and severity of the incretin mimetic effects on blood glucose level and renal sodium excretion in healthy animals. The potential action on the sympathoadrenal system is important to consider when assessing the risk of adverse side effects during incretin mimetic therapy.

Keywords: exenatide, glucagon-like peptide-1, epinephrin, norepinephrine, glycemia, natriuresis, adrenoreceptors, ganglionic blocker

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 612.822.1

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СТРЕССА МАТЕРИ
НА СОСТОЯНИЕ НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ РЕДОКС-СИСТЕМЫ
МОЗГА У САМЦОВ И САМОК КРЫС НА 20-Й ДЕНЬ
ЭМБРИОНАЛЬНОГО ПЕРИОДА РАЗВИТИЯ**

© 2024 г. А. В. Вьюшина¹, А. В. Притворова¹, *, С. Г. Пивина¹, В. К. Акулова¹, Н. Э. Ордян¹

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

*E-mail: pritvorovaav@infran.ru

Поступила в редакцию 27.06.2024 г.

После доработки 31.07.2024 г.

Принята к публикации 02.08.2024 г.

Исследовали влияние пренатального стресса, посттравматического стрессового расстройства, а также их сочетанного действия у крыс матерей на состояние гипофиз-адреналовой системы и окислительно-восстановительного баланса мозга у 20-дневных эмбрионов. Пренатальный стресс матерей приводил к повышению уровня кортикостерона в крови и снижению уровня восстановленного глутатиона в мозге у самцов эмбрионов. У самок эмбрионов повышался уровень продуктов Фентон-индуцированной окислительной модификации белков и снижался уровень восстановленного глутатиона в мозге. Моделирование посттравматического стрессового расстройства у матерей приводило к повышению уровня кортикостерона в крови, а также к снижению уровня продуктов Фентон-индуцированной окислительной модификации белков в мозге у самцов эмбрионов. У самок эмбрионов повышались уровни продуктов спонтанной и Фентон-индуцированной окислительных модификаций белков в мозге. Сочетанное действие двух видов стресса у матерей приводило к повышению уровня кортикостерона в крови, снижению уровня продуктов спонтанной и повышению Фентон-индуцированной окислительных модификаций белков, а также к снижению уровня восстановленного глутатиона в мозге у самцов эмбрионов. У самок повышались все исследованные показатели уровня продуктов окислительной модификации белков в мозге. Таким образом все три исследованных вида стресса у матери вызывают изменения в гипоталамо-гипофиз-адреналовой системе и в окислительно-восстановительном балансе мозга у 20-дневных эмбрионов. Эти изменения у самцов и самок эмбрионов различны, и у большинства исследованных показателей паттерн различий инвертирован по отношению к контрольной группе. Подобные трансформации у эмбрионов могут привести к негативным изменениям в нейроэндокринной системе у взрослых потомков стрессированных крыс матерей.

Ключевые слова: стресс матери, мозг, эмбриональный период, кортикостерон, окислительная модификация белков, глутатион

DOI: 10.31857/S1027813324040077, **EDN:** EGPU TH

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональное развитие — период, в котором генетические факторы и факторы внешней среды могут взаимодействовать и усугублять риски патологий в развитии потомства. Факторы окружающей среды воздействуют на эмбриональный мозг иначе, чем на мозг в постнатальном периоде. Пренатальный стресс (ПС) влияет на регуляцию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (ГГАС) плода и может передаваться следующему поколению различным образом в зависимости от пола, что согласуется с различиями в динамике развития

мужского и женского мозга [1]. Изменение уровня глюкокортикоидов в процессе эмбрионального развития является ключевым сигнальным путем, через который реализуются долгосрочные фенотипические эффекты, связанные с неблагоприятными условиями в раннем онтогенезе [2–4]. Многочисленные исследования показали, что одним из возможных последствий изменения уровня глюкокортикоидов являются эпигенетические процессы, которые могут приводить к долгосрочным модификациям, в том числе трансгенерационным [5, 6].

В настоящее время установлено, что повышение уровня глюкокортикоидов приводит

к окислительному стрессу [7]. В результате происходит трансформация нормальных процессов развития, вызванная нарушением межклеточного сигналинга продуктами окисления биомолекул. Окислительный стресс является одной из главных причин изменения эпигенетического профиля у пренатально стрессированного потомства [8]. Генерация активных форм кислорода (АФК) под контролем нормально сбалансированных механизмов антиоксидантной защиты клетки имеет важное физиологическое значение у эмбриона [9]. АФК, генерируемые различными внутриутробными состояниями, могут быть одним из ключевых нисходящих медиаторов, инициирующих эпигенетические процессы [10].

Продукты взаимодействия АФК с белками и липидами являются как маркерами патологии, так и одновременно мессенджерами в биохимических процессах в организме [11]. Одно из центральных мест в работе этих сигнальных систем принадлежит продуктам свободно радикального окисления белков, показателем которых является уровень окислительной модификации белков (ОМБ) [12]. В норме ОМБ играет важную роль в таких процессах, как фолдинг, протеолиз, внутриклеточный и межклеточный сигналинг. При патологических состояниях ОМБ участвует в дезорганизации протеолиза, активации апоптоза, канцерогенезе, и является маркером патологических процессов окислительного стресса [11]. Также ОМБ участвует в процессах метилирования, ацетилирования и деацетилирования, которые и приводят к эпигенетическим изменениям [13].

Глутатион является низкомолекулярным антиоксидантом и в то же время субстратом для антиоксидантных ферментов. Однако, глутатион не только защищает клетку от токсичных свободных радикалов, но и в целом определяет окислительно-восстановительные характеристики внутриклеточной среды. Он играет множество ролей в детоксикации, окислительно-восстановительной регуляции и передаче сигналов клетками. Многие процессы, которые могут регулироваться с помощью глутатиона, имеют решающее значение для развивающихся эмбрионов и включают клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [14]. Глутатион связан с редокс-регуляцией в эмбриогенезе, органогенезе и дисморфогенезе. Таким образом, глутатионовая регуляция редокс-чувствительных событий является одной из главных во время эмбрионального развития [15].

В настоящее время известно, что ПС оказывает транскгенерационное влияние на процессы свободнорадикального окисления биомолекул в различных тканях, затрагивая, в том числе, и различные отделы мозга, связанные с нейроэндокринной системой и когнитивными способностями [16]. Однако состояние системы про- и антиоксидантов

при посттравматическом стрессовом расстройстве (ПТСР) только начинают анализировать [17]. Имеются работы, указывающие на то, что ПТСР у родителей может способствовать предрасположенности к тревожным расстройствам и депрессии, задерживать физическое и поведенческое развитие потомков, способствовать изменениям в рецепции нейромедиаторов и экспрессии генов из-за нарушения регуляции метилирования [18, 19]. Однако исследования, посвященные влиянию ПТСР у родителей на окислительно-восстановительные процессы потомства немногочисленны. Кроме того, изучение влияния комбинированных стрессов, ведущих к транскгенерационным изменениям, таких как ПТСР родителей и ПС родителей, сейчас представляется весьма актуальным. В связи с этим в данной работе нами было исследовано влияние различных видов стресса у матери на уровень кортикостерона в крови, показатели ОМБ и восстановленного глутатиона в мозге у эмбрионов самцов и самок в позднем эмбриональном периоде (20-й день беременности).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на крысах Вистар из ЦКП “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург), с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Схема опыта представлена на рис. 1.

Животных весом 250–300 г содержали в условиях нормального цикла свет/темнота (12/12 ч.) при температуре 22°C в клетках для лабораторных мышей и крыс М-6 (“Профлаб”, Россия), свободном доступе к воде и комбикорму для лабораторных животных марки ЛБК-120 Тосненского комбикормового завода. В эксперименте все самцы F0 и F1 были интактными, не подвергавшимися никаким воздействиям.

Этап 1. При спаривании самок крыс с самцами подтверждали оплодотворение обнаружением сперматозоидов во влагалищном мазке и обозначали как нулевой день беременности. Беременные самки были случайным образом разделены на две группы: контрольные беременные крысы (n=12) и беременные крысы, подвергавшиеся иммобилизационному стрессу (n=12) для получения контрольного потомства F1 и пренатально стрессированного потомства F1 соответственно. Полученное потомство каждой крысы выравнивалось по полу и количеству.

Этап 2. Далее из потомков F1 в возрасте 3 месяца создавались 4 группы животных: интактные беременные крысы (контроль), пренатально стрессированные беременные крысы (ПС), беременные

по методу Lowry. Определяли продукты спонтанной (СОМБ) и Фентон-индуцированной (ФОМБ) окислительных модификаций белков. Индуцировали ОМБ реактивом Фентона, представляющим собой смесь ионов металла переменной валентности и H_2O_2 , генерирующей АФК. Спонтанная ОМБ является показателем, характеризующим базальный уровень окисления белков, общее физиологическое состояние организма. Фентон-индуцированная ОМБ рассматривается как показатель способности к приращению окисления, характеризует уровень синтеза белка и устойчивость ткани к перекислению [23].

Измерение продуктов производили на двух длинах волн 270 нм и 363 нм, что соответствовало карбонильным производным белков с разными аминокислотными остатками [24], образовавшимися на стадии инициации свободнорадикального окисления (первичные продукты) и элонгации (вторичные продукты) соответственно.

Количество продуктов ОМБ выражали в единицах оптической плотности, рассчитанной на 1 мг белка (Е/мг белка). Для оценки Фентон-индуцированного окисления белков использовали величину приращения ОМБ, вычитая из значений оптической плотности, полученной в пробе после индукции реактивом Фентона, значения оптической плотности спонтанного ОМБ.

Определение восстановленного глутатиона. Концентрацию восстановленного глутатиона определяли по способу, основанному на взаимодействии тиоловых групп с реактивом Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) – ДТНБ) [25]. После получения материалов для исследования к 0.3 мл гомогената мозга добавляли 0.1 мл 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Пробы центрифугировали в течение 10 мин при 2000g при температуре +4°C. Отбирали 0.05 мл полученного супернатанта и переносили в пробирки, содержащие 2.55 мл 0.1 М трис-НСl буфера с 0.01% ЭДТА и 0.003% ДТНБ (рН=8.5). Через 30 мин пробы фотометрировали на спектрофотометре Biotek power wave HT (USA) на волне 412 нм против холостой пробы, содержащей тот же объем супернатанта и буфера без ДТНБ. Результаты представляли в мкмоль/мг белка.

Определение уровня кортикостерона. При определении количества кортикостерона в сыворотке крови эмбрионов и их матерей был использован набор для ИФА ХЕМА-кортикостерон (Россия) и анализатор Thermo Scientific Multiskan FS (USA). Результаты выражали в нмоль/л.

Все реагенты, используемые при биохимических анализах, приобретены в фирме “Вектон”, Россия, за исключением стрептомицина (аптечный препарат, производство ОАО “Биохимик”, Россия) и ДТНБ (Merck, Germany).

Статистика. Статистическая обработка полученных результатов производилась с использованием пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Оценка нормальности распределения значений в выборках была проведена с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные анализировали с применением Factorial ANOVA. Анализировали влияние факторов “ПС”, “ПТСР” и “ПОЛ”. Сравнение уровня кортикостерона у матерей в четырех исследованных группах проводили с использованием Two-way ANOVA. При post-hoc анализе использовали критерий Тьюки. Сравнение уровня кортикостерона матерей с эмбрионами-самцами и с эмбрионами-самками проводили с использованием t-теста. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные на рисунках представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень кортикостерона (рис. 2) у матерей ниже, чем у 20-дневных плодов во всех исследованных группах ($p < 0.05$). Статистический анализ выявил влияние факторов “ПС” ($F_{1,20} = 360.18$, $p=0.000$) и “ПТСР” ($F_{1,20} = 169.42$, $p=0.000$), а также их взаимодействие ($F_{1,20} = 5.30$, $p=0.032$) на содержание кортикостерона в крови у матерей. Post-hoc анализ показал достоверное увеличение содержания кортикостерона у матерей в экспериментальных группах по сравнению с контролем. У эмбрионов при применении Factorial ANOVA обнаружено влияние фактора “ПТСР” ($F_{1,56} = 4.99$, $p=0.029$) и фактора “ПОЛ” ($F_{1,56} = 6.04$, $p=0.017$), а также совместное влияние факторов “ПС”, “ПТСР” и “ПОЛ” на уровень кортикостерона ($F_{1,56} = 5.65$, $p=0.021$). У самцов-плодов в экспериментальных группах также как и у матерей уровень кортикостерона увеличивается по сравнению с контролем ($p < 0.05$ post-hoc). У самок достоверных изменений уровня кортикостерона по сравнению с контролем не наблюдается. Межполовые различия имеются во всех группах, кроме группы с пренатально стрессированными матерями, причем в контрольной группе у самок уровень кортикостерона выше, а в группах ПТСР и ПС_ПТСР ниже по сравнению с самцами ($p < 0.05$ post-hoc).

При анализе с помощью Factorial ANOVA у эмбрионов обнаружено (рис. 3) влияние факторов “ПС” ($F_{1,40} = 4.93$, $p=0.032$), “ПТСР” ($F_{1,40} = 20.09$, $p = 0.000$) и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 67.18$, $p = 0.000$), а также совместное влияние трех вышеуказанных факторов на уровень первичных продуктов СОМБ ($F_{1,40} = 24.92$, $p = 0.000$). Уровень первичных продуктов СОМБ у самок не отличается во всех группах от контроля, а у самок увеличивается в группе ПС_ПТСР по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$ post-hoc). Межполовые

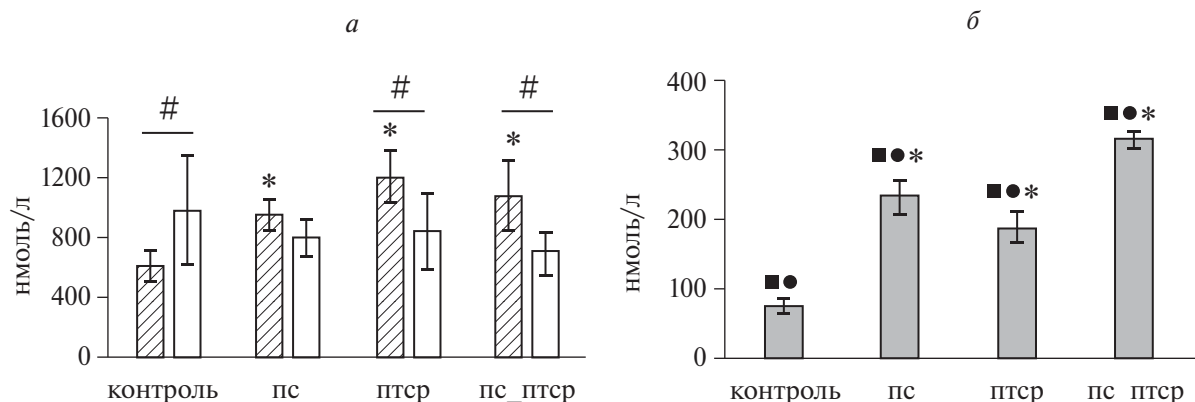


Рис. 2. Уровень кортикостерона в сыворотке крови у эмбрионов (самцы – заштрихованные столбики, самки – светлые столбики) и их матерей (серые столбики) в контроле и экспериментальных группах. *a* – эмбрионы; *b* – матери, * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.05$; # – статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; ■ – статистически значимые отличия от самцов-эмбрионов, $p < 0.05$; ● – статистически значимые отличия от самок-эмбрионов, $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

различия имеются во всех группах, кроме группы ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc).

На уровень первичных продуктов ФОМБ у эмбрионов (рис. 4) влияют факторы “ПС” ($F_{1,40} = 8.96$, $p = 0.004$), “ПТСР” ($F_{1,40} = 76.06$, $p = 0.000$) и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 154.97$, $p = 0.000$), а также выявлено совместное влияние факторов “ПС” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 4.39$, $p = 0.042$) и “ПТСР” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 161.47$, $p = 0.000$). Уровень первичных продуктов ФОМБ у самцов снижается до следовых количеств в группах с моделированием ПТСР у матерей и с сочетанным стрессом (ПС_ПТСР), у самок исследуемый показатель повышается во всех экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$ post-hoc). Межполовые различия имеются во всех 4 группах ($p < 0.05$

post-hoc), но в экспериментальных группах отличия инвертированы по сравнению с контрольными животными.

При применении Factorial ANOVA у эмбрионов обнаружено влияние фактора “ПС” ($F_{1,40} = 11.70$, $p = 0.001$ и совместное влияние факторов “ПС” и “ПТСР” ($F_{1,40} = 9.14$, $p = 0.004$), а также совместное влияние факторов “ПТСР” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 47.24$, $p = 0.000$) на уровень вторичных продуктов СОМБ (рис. 5). Уровень вторичных продуктов СОМБ у самцов снижается в группе ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc), а у самок увеличивается в группах с моделированием ПТСР у матерей и с сочетанным стрессом (ПС_ПТСР) по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$ post-hoc). Межполовые различия имеются во всех группах ($p < 0.05$ post-hoc),

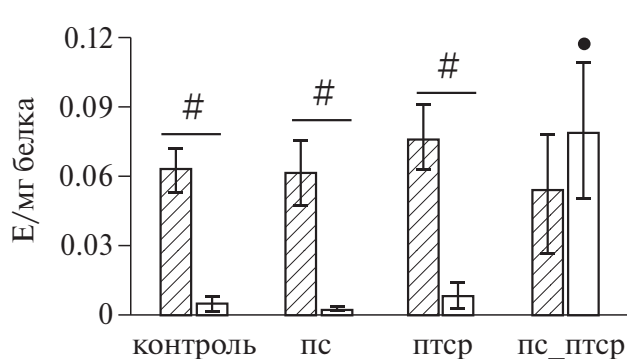


Рис. 3. Уровень СОМБ первичных продуктов в мозге у эмбрионов (самцы – заштрихованные столбики, самки – светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. ● – статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # – статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

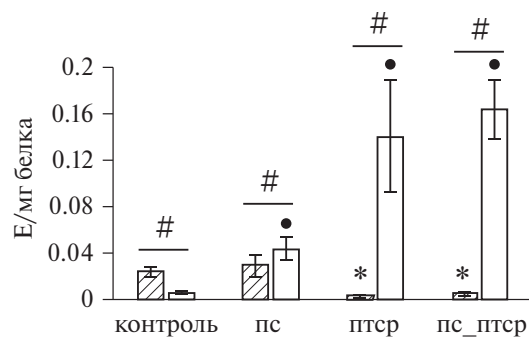


Рис. 4. Уровень ФОМБ первичных продуктов в мозге у эмбрионов (самцы – заштрихованные столбики, самки – светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. * – статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самцов $p < 0.05$; ● – статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # – статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

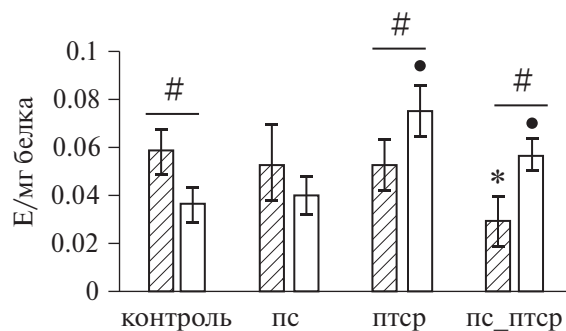


Рис. 5. Уровень СОМБ вторичных продуктов в мозге у эмбрионов (самцы — заштрихованные столбики, самки — светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. * — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самцов $p < 0.05$; ● — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # — статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

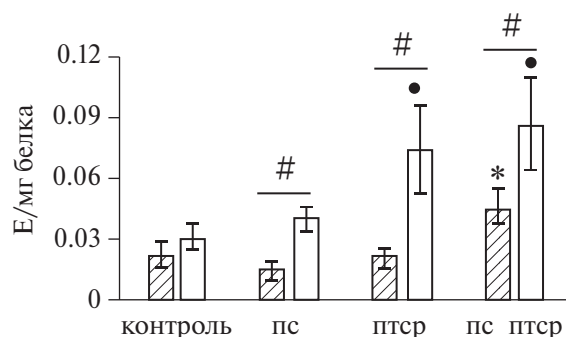


Рис. 6. Уровень ФОМБ вторичных продуктов в мозге у эмбрионов (самцы — заштрихованные столбики, самки — светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. * — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самцов $p < 0.05$; ● — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # — статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

кроме группы с ПС у матерей. В экспериментальных группах межполовые различия инвертированы по сравнению с контрольными животными.

На уровень вторичных продуктов ФОМБ (рис. 6) при применении Factorial ANOVA у эмбрионов обнаружено влияние факторов “ПС” ($F_{1,40} = 7.55$, $p = 0.008$), “ПТСР” ($F_{1,40} = 66.02$, $p = 0.000$) и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 69.20$, $p = 0.000$), а также совместное влияние факторов “ПС” и “ПТСР” ($F_{1,40} = 7.14$, $p = 0.011$) и “ПТСР” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 16.09$, $p = 0.000$). Уровень вторичных продуктов ФОМБ у самцов повышается в группе ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc), у самок повышается в группах ПТСР и ПС_ПТСР по сравнению с контрольной

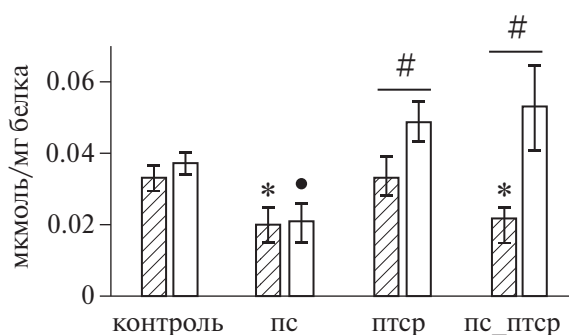


Рис. 7. Содержание восстановленного глутатиона в мозге у эмбрионов (самцы — заштрихованные столбики, самки — светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. * — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самцов $p < 0.05$; ● — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # — статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

группой ($p < 0.05$ post-hoc). Межполовые различия имеются во всех экспериментальных группах ($p < 0.05$ post-hoc), но у контрольных животных отсутствуют.

При анализе Factorial ANOVA у эмбрионов обнаружено влияние факторов “ПС” ($F_{1,40} = 22.29$, $p = 0.000$), “ПТСР” ($F_{1,40} = 33.65$, $p = 0.000$) и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 42.79$, $p = 0.000$), а также совместное влияние факторов “ПС”, “ПТСР” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 5.28$, $p = 0.026$) на содержание восстановленного глутатиона в мозге у эмбрионов (рис. 7). Количество восстановленного глутатиона в гомогенате мозга у самцов снижается в группе ПС и в группе ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc), а у самок только в группе ПС ($p < 0.05$ post-hoc) по сравнению с контрольной группой. Межполовые различия имеются в группе ПТСР а также в группе ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc).

ОБСУЖДЕНИЕ

Однократное неблагоприятное воздействие способно оставить след в поведении потомков последующих двух поколений и важная роль в передаче эффекта может принадлежать глюкокортикоидам матери [5, 6].

Уровень глюкокортикоидов у ПС животных и людей остается повышенным на протяжении всей жизни. Данные для людей, перенесших ПТСР демонстрируют снижение этого показателя [26], тогда как у беременных крыс с моделированием ПТСР этот показатель относительно контроля повышен [19]. В работе нашей лаборатории через 1 сутки после комбинированного стресса и рестресса у ПС самок уровень кортикостерона в крови повышается,

но к 10 и 30 сут. становится более низким, чем у контрольных животных [27]. Авторы Louvart et al. [28] также демонстрируют более резкую реакцию на стресс у ПС самок с более значительным снижением уровня кортикостерона после стресса. Учитывая схему опыта и состояние беременности, наши данные об уровне кортикостерона у крыс матерей совпадают с данными литературы. Обращает на себя внимание усиление активации ГГАС при сочетанном стрессе беременных крыс.

Отсутствие реакции ГГАС у плодов самок и увеличение уровня кортикостерона у плодов самцов может быть объяснено тем, что ГГАС плода способна реагировать на материнский стресс на поздних сроках беременности, однако, у самцов наблюдается значительное увеличение уровня АКТГ в ответ на материнский стресс с 18-го дня, тогда как у самок этого не наблюдается до 20-го дня внутриутробного развития [29].

Одним из последствий ПС, как известно, является нарушение функционирования ГГАС у потомков обоего пола [30]. В нашем эксперименте в группе с ПС у матерей отсутствуют межполовые различия у плодов самцов и самок за счет повышения уровня кортикостерона у плодов мужского пола. Можно предположить, что на позднем сроке эмбрионального развития у самцов, родившихся от пренатально стрессированных матерей, наблюдаются изменения функционирования ГГАС. Компонент моделирования ПТСР у матери оказывает усиливающее воздействие на уровень кортикостерона у плодов самцов и межполовая разница в экспериментальных группах становится инвертированной относительно контроля.

Важнейшим звеном, осуществляющим реализацию генетической программы развития, являются гормоны. В ответ на стресс глюкокортикоиды непосредственно воздействуют на геном развивающегося плода, вызывая нарушения гетерохронии в развитии [31]. Следствием этого могут быть изменения функций ЦНС, и, как следствие, физиологические или психические нарушения. ОМБ можно рассматривать как систему внутренней модуляции и передачи информации как от внешней среды к внутриклеточным системам, так и наоборот. В тоже время в соответствии с двойственной ролью АФК, ОМБ можно рассматривать как маркер патологии [32, 33]. В нашем исследовании на 20-й день эмбрионального развития у плодов мужского пола в мозге уровень первичных продуктов ОМБ во всех исследованных группах демонстрирует сходную картину — сравнительно высокий уровень спонтанного окисления и низкий — Фентон-индуцированного, так же как уровень вторичных продуктов в трех исследованных группах. Однако в группе с сочетанным стрессом наблюдается обратное соотношение вторичных продуктов ОМБ — снижение спонтанного и повышение

Фентон-индуцированного ОМБ. Соотношение спонтанного и Фентон-индуцированного ОМБ в мозге плодов на 20-й день эмбрионального развития возможно свидетельствует о несформировавшейся системе окислительного метаболизма белков. Можно заключить, что потомство мужского пола на данном сроке эмбрионального развития не демонстрирует изменений в ОМБ, за исключением групп с моделированием ПТСР у матери. По-видимому, фактор ПТСР у матери оказывает влияние на процессы в мозге, связанные с Фентон-индуцированным ОМБ, что может свидетельствовать о нарушении белкового синтеза.

На 20-й день эмбрионального развития у плодов женского пола в мозге уровень первичных продуктов СОМБ в трех исследованных группах очень низкий по сравнению с этим показателем у плодов мужского пола. Однако в группе с сочетанным стрессом этот показатель значительно повышен по сравнению с контролем. Уровень ФОМБ в контрольной группе также низкий, повышается в группе с ПС у матерей, а в группах с моделированием ПТСР у матерей этот показатель повышается в 2–3 раза по сравнению с уровнем ФОМБ в группе с ПС у матерей. Уровень вторичных продуктов СОМБ и ФОМБ не отличается в группах контроля и ПС у матерей, тогда как в группах с моделированием ПТСР у матерей этот показатель почти в два раза превышает уровень группы контроля. Можно заключить, что потомство женского пола на данном сроке эмбрионального развития в группах с моделированием ПТСР у матерей демонстрирует усиление как процессов свободнорадикального окисления в мозге, так и усиление процессов белкового синтеза.

В целом, процессы ОМБ у плодов женского пола контрольной группы на 20-й день эмбрионального развития сходны с картиной плодов мужского пола — относительно высокий уровень СОМБ и крайне низкий уровень ФОМБ, что может свидетельствовать о несформированности системы окислительного метаболизма белков. Однако реакция мозга плодов-самок на стресс матери кардинальным образом отличается от этих же процессов у плодов мужского пола. У плодов женского пола на данном сроке эмбрионального развития представленные в исследовании группы с различными стрессами у матерей демонстрируют более драматическое влияние исследованных стрессов на процессы ОМБ. Возможно, это связано с разницей в процессах дифференцировки и созревании мозга у эмбрионов мужского и женского пола [34]. По-видимому, у самцов наиболее чувствительной к влиянию стресса матери оказывается система ГГАС, а у самок — более чувствительны окислительно-восстановительная система и процессы синтеза белка в мозге.

Эмбриональное развитие включает в себя точно организованные события и процессы, в том числе изменения клеточной пролиферации, дифференцировки и лево-правой асимметрии, которые зависят от сигнальной трансдукции при участии АФК и внутриклеточных редокс-потенциалов, ключевую роль в этих процессах регуляции эмбриогенеза играет глутатион [9].

В контрольной группе и группе с ПС у матерей уровень восстановленного глутатиона у плодов-самок и у плодов-самцов не различается, однако в группе с ПС у матерей значительно снижается у плодов обоего пола (по сравнению с контролем). В группе с моделированием ПТСР у матерей уровень глутатиона у плодов обоего пола не отличается от показателей контрольной группы, при этом появляется межполовая разница по этому показателю. В группе сочетанного стресса у матерей уровень восстановленного глутатиона у плодов-самок снижается по сравнению с контрольными значениями, тогда как у самок этот показатель остается без изменений, формируя межполовые различия. Можно заключить, что ПС у матери связан со снижением уровня восстановленного глутатиона у плодов-самцов в обеих группах с влиянием такого стрессирующего фактора как ПС. В то же время у плодов-самок уровень восстановленного глутатиона снижается только в группе с ПС у матерей, тогда как моделирование ПТСР у матерей не оказывает влияния на этот показатель, а в группе сочетанного стресса возможно снимает влияние ПС у матери. В ранее проведенных в нашей лаборатории исследованиях обнаружено, что ПС в первом поколении изменяет динамику показателей окислительного стресса в постнатальном онтогенезе [32], что возможно связано с изменением сроков дифференцировки и морфогенеза на ранних этапах пренатального развития. Однако изменение свободнорадикального окисления биомолекул, вызванное ПС, прослеживается и во втором поколении уже у потомства ПС матерей [16, 35]. По-видимому, снижение уровня глутатиона, наблюдаемое у группы ПС в нашем исследовании свидетельствует об изменении окислительно-восстановительного баланса, который поддерживается системой окислительно-восстановительного буфера, создаваемого в эмбриогенезе глутатионом [15]. Возможно процессы дифференцировки, контролируемые глутатионом [14] не зависят от пола, однако изменения в редокс-балансе секс-детерминированы, и это отражается на глутатионовой системе регуляции эмбриогенеза. Кроме того, можно предположить, что стрессорные воздействия, испытанные матерями, уменьшают интенсивность окислительно-восстановительных процессов у плодов-самцов и усиливают у самок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Влияние ПС у матерей и моделирования ПТСР у матерей на редокс систему мозга плодов в позднем эмбриональном периоде различается, эти различия секс-детерминированы. По-видимому, у самцов наиболее чувствительной к влиянию стресса матери оказывается система ГГАС, а у самок — окислительно-восстановительные процессы и процессы синтеза белка в мозге. Не исключено, что выявленные нами изменения показателей свободнорадикального окисления и уровня восстановленного глутатиона могут свидетельствовать об изменении сроков дифференцировки и морфогенеза у потомства как во втором поколении пренатально стрессированных животных, так и у потомства крыс-матерей, подверженных ПТСР.

Изменения в редокс-системе мозга в эмбриональном развитии могут привести к негативным последствиям в функционировании ЦНС и ГГАС у взрослых потомков стрессированных крыс-матерей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН (№ 1023032400236-8-3.1.4.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mattern F., Post A., Solger F., O'Leary A., Slattery D.A., Rief A., Haaf Th. // Behav. Brain Res. 2019. V. 359. № 1. P. 143–148. doi: 10.1016/j.bbr.2018.10.037.
2. Дыгало Н.Н., Науменко Е.В. // Онтогенез. 1984. Т. 15. № 2. С. 215–218.
3. Ордян Н.Э., Пивина С.Г. // Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89. № 1. С. 52–59. doi: 10.1023/b:neab.0000028286.83083.73.
4. Krontira A.C., Cruceanu C., Binder E.B. // Trends. Neurosci. 2020. V. 43. № 6. P. 394–405. doi: 10.1016/j.tins.2020.03.008.
5. Дыгало Н.Н. // Журн. высш. нерв. Деят. 1999. Т. 49. Вып. 3. С. 489–494.
6. Yao S., Lopes-Tello J., Sferruzzi-Perri A.N. // Biology of Reproduction. 2021. V. 104. № 4. P. 745–770. doi: 10.1093/biolre/iaaa232.

7. Signorello M.G., Ravera S., Leoncini G. // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. № 7. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms25073776>
8. Mikhed Y., Gorlach A., Knaus U.S., Daiber A. // Red. Biol. 2015. V. 5. P. 275–289. doi: 10.1016/j.redox.2015.05.008.
9. Timme-Laragy A.R., Goldstone J.V., Imhoff B.R., Stegeman J.J., Hahn M.E., Hansen J.M. // Free rad. Biol. Med. 2013. V. 61. P. 1–30. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.011.
10. Thompson L.P., Al-Hasan Y. // J. Pregnancy. 2012. V. 2012. P.1–8. doi: 10.1155/2012/582748.
11. Schieber M., Chandel N.C. // Curr. Biol. V. 24. № 10. P. 453–462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
12. Луцак В.И. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 8. С. 995–1016.
13. Cao-Lei L., Rooij S.R., King S., Matthews S.G., Metz G.A.S., Roseboom T.J., Szyf M. // Neurosci. Biobehav. 2020. V. 117. P. 198–210. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.05.016.
14. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56. № 6. С. 675–662. doi: 10.18097/PBMC20105606657.
15. Hansen J.M., Harris C. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1850. № 8. P. 1527–42. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.12.001.
16. Huerta-Cervantes M., Peña-Montes D.J., López-Vázquez M.A., Montoya-Pérez R., Cortés-Rojo C., Olvera-Cortés M.E., Saavedra-Molina A. Nutrients. 2021. V. 13. № 5. P. 1–15. doi: 10.3390/nu13051575.
17. Karanikas E., Daskalakis N.P., Agorastos A. // Brain Sci. 2021. V. 11. № 6. P. 1–28. doi: 10.3390/brainsci11060723.
18. Zhang X.G., Zhang H., Liang X.L., Liu Q., Wang H.Y., Cao B., Cao J., Liu S., Long Y.J., Xie W.Y., Peng D.Z. // Genet. Mol. Res. 2016. V. 15. № 3. P. 1–17. doi: 10.4238/gmr.15039009.
19. Chagas L.A., Batista T.H., Ribeiro A.C.A.F., Ferrari M.S., Vieira J.S., Rojas V.C.T., Kalil-Cutti B., Elias L.L.K., Giusti-Paiva A., Vilela F.C. // Behav. Brain Res. 2021. V. 399. P. 1–9. doi: 10.1016/j.bbr.2020.113026.
20. Кострова Т.А. Биохимические и поведенческие показатели в отдаленный период после острых отравлений нейротоксикантами и их фармакологическая коррекция. Дисс... канд. мед. Наук. СПб: Институт токсикологии ФМБА, 2019. 188 с.
21. Ордян Н.Э., Смоленский И.В., Пивина С.Г., Акулова В.К. // Журн.высш.нервн.деят. 2013. Т. 63. № 2. С. 280–289. doi: 10.7868/S0044467713020068.
22. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб: ИКФ “Фолиант”. 2000. 104 с.
23. Кузьменко Д.И., Лаптев Б.И. // Вопр. мед. химии. 1999. Т. 45. № 1. С. 47–54. PMID: 10205828.
24. Назаров И.Н., Казичина Л.А., Зарецкая И.И. // Журн. общ. химии. 1956. Т. 27. № 3. С. 606–623.
25. Lovlin V.N., Vinichenko E.L., Sevostianov I.A. // The Journal of scientific articles “Health and Education Millennium”. 2017. V. 19. № 7. P.113–115.
26. Yehuda R., Bierer L.M. // Prog. Brain Res. 2008. V. 167. P. 121–135. doi: 10.1016/S0079-6123(07)67009-5.
27. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Миронова В.И., Ракицкая В.В., Акулова В.К. // Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 12. С. 1409–1420.
28. Louvart H., Maccari S., Vaiva G., Darnaudery M. // Psychoneuroendocrinology. 2009. V. 34. P. 786–790. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.12.002.
29. Sze Y., Brunton P.J. // Eur. J. Neuroscience. 2019. V. 52. P. 2487–2515. doi: 10.1111/ejn.14615.
30. Soares-Cunha C., Coimbra B., Borges S., Domingues A.V., Silva D., Sousa N., Rodrigues A.J. // Front. Behav. Neurosci. 2018. V. 12. P. 1–15. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00129.
31. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э. // Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. СПб.: “Десятка”, 2007. 240 с.
32. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флеров М.А. // Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 3. С. 240–246.
33. Reed E.C., Case A.J. // Front. Physiol. 2023. P. 1–13. doi: 10.3389/fphys.2023.1130861.
34. Mora S., Dussaubat N., Diaz-Veliz G. // Psychoneuroendocrinology. 1996. V. 21. № 7. P. 609–620. doi: 10.1016/s0306-4530(96)00015-7.
35. Aiken C.E., Tarry-Adkins J.L., Spiroski A., Nuzzo A.M., Ashmore T.J., Rolfo A., Sutherland M.J., Camm E.J., Giussani D.A., Ozanne S.E. // The FASEB Journ. 2019. V. 33. № 6. P. 7758–7766. doi: 10.1096/fj.201802772R.

The Effect of Various Types of Mother Stress on the Some Components of the Brain Redox System in Male and Female Rats on the 20th Day of the Embryonic Development Period

A. V. Vyushina¹, A. V. Pritvorova¹, S. G. Pivina¹, V. K. Akulova¹, and N. E. Ordyan¹

¹Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

The effect of prenatal stress, post-traumatic stress disorder, and their combined effect in rat mothers on the condition of the pituitary-adrenal system and the brain redox balance in 20-day-old embryos was studied. Mother's prenatal stress result in increase the level's corticosterone in the blood and decrease the level of reduced glutathione in the brain of male embryos. In female embryos, the level of Fenton-induced products of proteins oxidative modification increased and the reduced glutathione level in the brain decreased. Modeling of post-traumatic stress disorder in mother result in an increase in the corticosterone level in the blood, and a decrease in the level of Fenton-induced products of proteins oxidative modification in the brain of male embryos. In female embryos, the levels of products of spontaneous and Fenton-induced oxidative modifications of proteins in the brain increased. The combined effect of two types of stress in mother result in an increase in levels corticosterone in the blood, a decrease in the spontaneous products level and an increase in Fenton-induced products level of proteins oxidative modifications, and a decrease in the reduced glutathione level in the male embryos brain. In female embryos, all the studied indicators of proteins oxidative modification products in the brain increased. Thus, all three studied types of stress in the mother cause changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal system and in the brain redox balance in 20-day-old embryos. These changes are different in male and female embryos, and in most of the studied indicators, the pattern of differences is inverted in relation to the control group. Such changes at embryos can result in negative changes in the neuronal organization in adult offspring of stressed rat mothers.

Keywords: mother stress, brain, embryonic period, corticosterone, protein oxidative modification, glutathione

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК: 577.25

**РАЗВИТИЕ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС
OXYS СОПРОВОЖДАЕТСЯ СНИЖЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ
ДОФАМИНОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА
(CDNF) И НЕ КОМПЕНСИРУЕТСЯ ЕГО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ**

© 2024 г. Я. П. Каминская¹, Т. В. Ильчибаева¹, Т. А. Козлова¹, Н. Г. Колосова¹,
В. С. Науменко¹, А. С. Цыбко¹, *

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*E-mail: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2024 г.

После доработки 14.07.2024 г.

Принята к публикации 18.07.2024 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, приводящее к сенильной деменции. Известно, что процессы нейродегенерации тесно связаны с нейротрофическим обеспечением. В этой работе, проведенной на модели БА – линии быстроста-реющих крыс OXYS, впервые был выявлен дефицит CDNF в гиппокампе, а также предпринята попытка его компенсации путём индукции сверхэкспрессии с помощью аденоассоциированного вирусного конструкта. Конструкты были введены в область дорсального гиппокампа крыс в возрасте трёх месяцев. Через 15 месяцев после введения конструкта нами была показана сверхэкспрессия CDNF в целевой структуре, но не было выявлено ее эффекта на обучение и память животных в водном лабиринте Морриса, а также на накопление A β и Tau-белка и экспрессию генов, вовлеченных в реакцию несвернутых белков (UPR).

Ключевые слова: нейротрофические факторы, дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF), крысы OXYS, болезнь Альцгеймера

DOI: 10.31857/S1027813324040085, EDN: EGPQEI

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, приводящее к сенильной деменции. Отличительными чертами БА является формирование внеклеточных бляшек из белка β -амилоида (A β), гиперфосфорилирование и агрегация связанного с микротрубочками Tau-белка [1]. Оба процесса в конечном счете приводят к нейровоспалению, синаптическим повреждениям и гибели нейронов.

БА обладает сложным патогенезом и одним из ключевых звеньев вероятно является дисбаланс нейротрофических факторов (НТФ). Еще в 1981 году Arpeel выдвинул универсальную теорию для нейродегенеративных заболеваний – каждое из нарушений обусловлено отсутствием специфического нейротрофического фактора [2]; со временем она была модифицирована, однако звание “перспективных мишеней” за НТФ закрепилось [3]. В контексте БА наиболее изученными являются

фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) и нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Так, для NGF было показано нарушение процесса созревания и увеличение деградации его зрелой формы [4, 5]; а относительно BDNF данные периферической крови, спинномозговой жидкости и post-mortem исследования образцов головного мозга последовательно указывают на снижение экспрессии BDNF при БА [6, 7]. Были предприняты попытки использовать эти НТФ для лечения БА, однако исследования были остановлены из-за ряда причин: 1) НТФ не способны преодолеть гематоэнцефалический барьер; 2) BDNF при интрацеребральном введении обладает коротким периодом полувыведения и низким распределением; 3) инъекция NGF в желудочки головного мозга сопровождалась тяжелыми побочными эффектами [8, 9]. NGF был опробован в трех клинических испытаниях, результаты которых оказались неоднозначными [10]. В первом использовались аутологичные фибробласты,

модифицированные для синтеза NGF, однако, изменений со стороны когнитивных функций и метаболической активности нейронов зафиксировано не было [11]. Во втором исследовании в качестве вектора использовались эпителиальные клетки сетчатки и только у двух пациентов имели место положительные изменения в когнитивных тестах [12]. Для третьего клинического исследования на общей выборке в 49 человек в качестве способа доставки был выбран аденоассоциированный вирусный вектор, однако различий в когнитивных результатах не наблюдалось, что было связано с плохим распространением NGF и неэффективным выбором координат [13].

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF) достаточно сильно отличается от “классических” НТФ. Для него не было найдено специфических рецепторов на плазматической мембране клеток и не обнаружено формы-предшественника, кроме того, CDNF может как находиться в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭПР), так и секретироваться клетками [14]. Именно локализацией в ЭПР и участием в реакции несвернутых белков (unfolded protein response, UPR) объясняют его нейропротекторные и нейровосстановительные свойства [15]. CDNF исследовался главным образом в качестве потенциального терапевтического агента при болезни Паркинсона (БП) и уже успешно прошел первую стадию клинических испытаний [16]. Несмотря на растущее количество доказательств участия стресса ЭПР в патогенезе БА, данные о применении CDNF на животных моделях БА ограничиваются лишь одной публикацией [17]. В указанной работе было показано, что как вирус-опосредованная сверхэкспрессия CDNF, так и инъекция рекомбинантного белка CDNF улучшает долговременную память на мышах линии APP/PS1 [17]. Кроме того на первичной культуре клеток гиппокампа крыс было показано, что обработка белком CDNF уменьшает синаптотоксичность β -амилоида, а также смягчает стресс ЭПР за счет снижения Bip (binding immunoglobulin protein – белок, связывающий иммуноглобулины, известный также как глюкозо-регулируемый белок – GRP78) и pEIF2 (eukaryotic initiation factor 2 – эукариотический фактор инициации 2) [18].

В данной работе мы оценили межлинейное различие экспрессии CDNF у крыс Вистар и крыс линии OXYS – спорадической модели БА [19]. Эти животные демонстрируют фенотип раннего старения и характеризуются той же последовательностью патогенетических событий, что и у пациентов с БА: дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование Тау-белка, деструктивные изменения нейронов, нарушения поведения и снижение когнитивных функций на ранних стадиях и их прогрессия на фоне повышения уровня

белка-предшественника амилоида (Amyloid-beta precursor protein, APP) и усиленного накопления A β [20]. Примечательно, что для крыс OXYS ранее было показано, что проявления признаков БА предшествуют изменениям баланса системы НТФ [21, 22].

Далее мы предприняли попытку скомпенсировать выявленный дефицит CDNF с помощью индукции его сверхэкспрессии в гиппокампе и оценили ее влияние на экспрессию ключевых в контексте БА генов, генов UPR, а также когнитивные способности животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. Эксперимент проводился в два этапа. Первый этап: оценка межлинейных различий и возрастной динамики (20 дней/3.5 месяца/18 месяцев) экспрессии *Cdnf* в гиппокампе крыс линии OXYS и крыс Вистар ($n = 6$). Гиппокамп – структура мозга, которая поражается при БА одной из первых [23], кроме того, для крыс OXYS ранее была показана возраст-зависимая потеря нейронов и накопление A β в этой структуре [19]. Второй этап: введение вирусного вектора, кодирующего целевой белок или флуоресцентную метку крысам линии OXYS, с последующим тестированием животных для оценки пространственного обучения и памяти (рис. 1).

Плазмиды. С помощью праймеров (F5'- tag ctGGATCCccaccatgcgggtgcaccagtccg – 3' и R5'- tagctACCGGTtcagagctctgttgggggc – 3'), содержащих сайты распознавания эндонуклеаз рестрикции BamHI и AgeI, мы синтезировали ген *Cdnf* крысы, используя кДНК крыс Вистар в качестве матрицы. Полученную последовательность обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и AgeI (New England Biolabs, США), и лигировали в вектор pAAV-Syn-EGFP для экспрессии под контролем синапсного промотора. Ген *Cdnf* содержал стоп-кодон, для получения функциональной формы CDNF без зелёного флуоресцентного белка (EGFP) на С-конце. Данный стоп-кодон, тем не менее, позволяет экспрессироваться EGFP в количестве достаточном для контроля эффективности экспрессии плазмиды в нейронах млекопитающих. В качестве контроля использовали плазмиду, несущую только ген EGFP. Все этапы клонирования были проверены секвенированием по Сэнгеру, которое было проведено на базе ЦКП “Геномика” СО РАН.

Клеточная культура и трансфекция. Клетки НЕК 293FT # РТА-5077 (“АТСС”, США) использовали для получения векторов рекомбинантного аденоассоциированного вируса. Линию клеток поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS (“Sigma-Aldrich”, США) и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина (“Sigma-Aldrich”), при 37°C

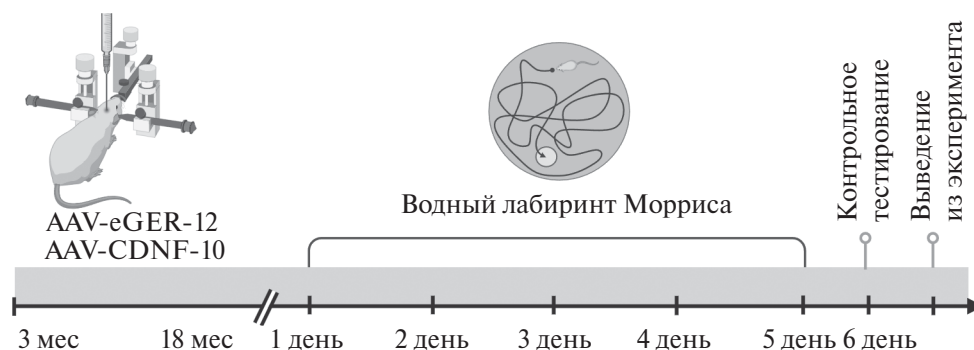


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

в атмосфере 5% CO₂. Клетки пассировали при кон-
флюентности не менее 70%, и культуральную среду
обновляли каждые 2–3 дня.

Упаковку AAV-Syn-CDNF-EGFP и AAV-Syn-
EGFP в капсиды AAV проводили путём котранс-
фекции с плазмидами AAV-DJ и рHelper (“Cell
Biolabs Inc”, США) в НЕК-клетки. Вирусные ча-
стицы собирали через 48 ч согласно протоколу,
описанному Гриммом и соавторами [24]. Количе-
ство полученных вирусных частиц определяли ме-
тодом количественной ПЦР (кПЦР) как было опи-
сано ранее [25].

Экспериментальные животные. Исследования
проводились на самцах аутбредных крыс Вистар
и крыс линии OXYS, полученных из лаборатории
молекулярных механизмов старения Института
цитологии и генетики (Новосибирск, Россия).
Животных содержали в стандартных условиях при
искусственном 12-часовом освещении и свободном
доступе к сбалансированному корму и воде.
Начиная с четырехнедельного возраста животных
содержали группами по 4–5 особей в клетках раз-
мерами 50×33×20 см.

В возрасте 3 мес. животным осуществляли инъ-
екцию аденоассоциированного вирусного век-
тора (AAV), кодирующего CDFN (AAV-CDNF,
n = 10) или зелёный флуоресцентный белок (EGFP)
(AAV-EGFP, n = 12). В возрасте 18 месяцев (что
соответствует стадии прогрессии признаков БА)
тестировали животных в водном лабиринте Мор-
риса (рис. 1).

Крысы были декапитированы через 24 ч после
окончания поведенческих тестов. Мозг был из-
влечён на лду, образцы гиппокампа были выде-
лены, заморожены в жидком азоте и хранились при
температуре –80 °C до процедур выделения РНК
или белка.

Стереотаксическое введение в гиппокамп. Перед
проведением процедуры животных наркотизиро-
вали смесью 2,2,2-трибромэтанола и 2-метил-2-бу-
танола; после помещали в стереотаксическую уста-
новку (“TSE Systems”, Германия). Далее череп

билатерально просверливали, согласно коорди-
нам AP: –2.6 мм; ML: 1.5 мм; DV: 3.0 мм ([https://labs.
gaidi.ca/rat-brain-atlas/?ml=%2B1.5&ap=-2.6&dv=3](https://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/?ml=%2B1.5&ap=-2.6&dv=3)).
Вирусные частицы (1 мкл), разведённые в 1× PBS
до концентрации 10⁹ вирусных частиц в мкл, мед-
ленно вводили микрошприцем в гиппокамп со ско-
ростью 0.1 мкл/мин в течение 10 мин. После инъек-
ции иглу оставляли в месте инъекции ещё на 2 мин,
чтобы минимизировать утечку вирусной суспензии
при извлечении иглы.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК
выделяли с помощью ExtractRNA (“Евроген”, Рос-
сия), обрабатывали ДНКазой без РНКазной актив-
ности (RNase free DNase, 1000 о.е./мл; “Promega”,
США) в соответствии с протоколами производ-
телей. РНК разводили водой до концентрации
0.125 мкг/мкл и хранили при –80°C. На основе по-
лученной общей РНК синтезировали кДНК. ПЦР
проводили на амплификаторе LightCycler 480 System
(“Roche”, Швейцария). кДНК (1 мкл) смешивали
с 19 мкл смеси Master mix, содержащей краситель
SYBR Green I (“Синтол”, Россия), приготовленной
согласно инструкции производителя. Праймеры,
используемые для амплификации кДНК исследуе-
мых генов, представлены в табл. 1. Серия разведе-
ний геномной ДНК с концентрацией 0.0625, 0.125,
0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл была ам-
плифицирована одновременно и была использо-
вана как внешний стандарт для построения кали-
бровочной кривой. Калибровочная кривая была
построена автоматически программным обеспе-
чением LightCycler 480 (“Roche Applied Science”).
Для контроля специфичности амплификации ис-
пользовался анализ кривой плавления для каждого
прогона каждой пары праймеров. Экспрессию ге-
нов представляли как отношение количества копий
кДНК анализируемого гена к 100 копиям гена
rPol2a, выполняющего функцию внутреннего стан-
дарта [26–28]. Для сплайсированной (sXbp1) и несп-
лайсированной (uXbp1) форм Xbp1 расчёт произ-
водился по методу ΔΔCt с помощью программного
обеспечения амплификатора.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики используемых праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °C	Длина ПЦР продукта, пн
<i>rPol2a</i>	F 5'- ttgtcgggcagcagaacgtg -3' R 5'- caatgagaccttctcgtctctccc -3'	62	186
<i>Cdnf</i>	F 5'- gaagaaattggacttggaatctg -3' R 5'- ccagttctttaatgaggttcac -3'	61	137
<i>Atf6</i>	F 5'- accatagcaagcactgtcca -3' R 5'- aggacttagccgccattgtg -3'	60	175
<i>Grp78</i>	F 5'- cgcctgacctctaagaaat -3' R 5'- gagacagcttacctcccagc -3'	60	169
<i>Perk</i>	F 5'- cagtgactcagaggacgcag -3' R 5'- tggacgcattatcacagcca -3'	60	200
<i>Ire1a</i>	F 5'- tgtggacagtgaatctgggg -3' R 5'- cgtaggtctccacagcaac -3'	60	129
<i>sXbp1</i>	F 5'- gctgagtcgcagcaggt -3' R 5'- cagggtccaactgtccagaat -3'	60	130
<i>uXbp1</i>	F 5'- cagactacgtgcacctctgc -3' R 5'- cagggtccaactgtccagaat -3'	60	139
<i>Mapt</i>	F 5'- gtttctgcttcgggggtctc -3' R 5'- ggaatgtgaactcaggggca -3'	66	184
<i>Cdk5</i>	F 5'- cctgttgagtgaacccagtcg -3' R 5'- ctgggaggagagcttaaataggtc -3'	65	141
<i>App</i>	F 5'- agcagaactactccgacgac -3' R 5'- gctgaattcgccattcacgg -3'	60	137

Вестерн-блот-анализ. Для определения уровня общего белка образцы ткани гомогенизировали в 500 мкл лизирующего буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl (pH 8.4), 300 мМ NaCl, 4 мМ EDTA, 0.2% (w/v) Triton X-100; 1 мМ NaVO₄, 2 мМ PMSF, 1 мМ смеси ингибиторов протеаз ("Sigma-Aldrich"). Гомогенат инкубировали на льду 60 мин и центрифугировали (12 000 g, 15 мин) с последующим отбором супернатанта. Количество общего белка было измерено по методу BCA с использованием коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit ("Thermo Fisher Scientific Inc."). Пробы разводились до концентрации 1500 мкг/мл с помощью 2-кратного буфера Лэммли и хранились при температуре -20°C. Проводили термическую обработку проб для денатурации белка (5 мин, 95°C). Экстракты белка (15 мкг на дорожку) разделяли с помощью 10%-ного разделяющего SDS-PAGE. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану ("Bio-Rad", США) с помощью системы для полусухого электроблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System ("Bio-Rad").

Для иммунодетекции белка мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком, разведённым в буфере TBS-T (Tris Bufferd Saline, "Bio-Rad Laboratories Inc.", США) с добавлением 0.05% (v/v) Tween 20, в течение часа при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи (табл. 2).

После первичных антител мембрану отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T и инкубировали со вторичными поликлональными антителами (табл. 1), конъюгированными с пероксидазой хрена, при комнатной температуре в течение часа. Затем мембрану снова отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T.

Связанные антитела визуализировались с помощью Clarity Western ECL ("Bio-Rad"), в соответствии с инструкцией производителя, и сканера C-Digit Blot Scanner ("Li-Cor", США), с последующей количественной оценкой при помощи программы Image Studio Lite 5.2.

Для каждой мембраны проводилось измерение конститутивного белка GAPDH в качестве

Таблица 2. Характеристики используемых в работе антител

Белок	Первичные антитела:		Вторичные антитела: разведение, шифр производителя
	разведение	шифр производителя	
CDNF	1 : 500	Pag458Mu01 (CloudClone, США)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 (Invitrogen, США)
TAU	1 : 2000	АНВ0042 (Invitrogen, США)	Против мыши 1: 30 000 Ab 6728 (Abcam, Великобритания)
phospho-TAU Ser202/Thr205	1 : 1000	MN1020 (Invitrogen, США)	
CDK5	1 : 500	AF6371 (Affinity Biosciences, Австралия)	
phospho-CDK5 Tyr15	1 : 500	AF3371 (Affinity Biosciences, Австралия)	Против кролика 1 : 3 000 G-21234 (Invitrogen, США)
phospho-CDK5 Ser159	1 : 1000	AF8366 (Affinity Biosciences, Австралия)	
APP	1 : 200	AF6084 (Affinity Biosciences, Австралия)	Против кролика 1 : 7 000 G-21234 (Invitrogen, США)
GAPDH	1 : 7000	Ab 8245 (Abcam, Великобритания)	Против мыши 1:30 000 ab6728 (Abcam, Великобритания)

внутреннего стандарта для дальнейшей нормировки. Экспрессия белка выражалась в относительных единицах.

Иммунофлуоресцентный анализ. Животные (n = 2) транскардиально последовательно перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4%-ным раствором параформальдегида. Мозг извлекали и постфиксировали 4%-ным параформальдегидом на 6 ч, затем погружали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS на 2 дня. Последовательные срезы толщиной 14 мкм делали в криостате (“Thermo Scientific”, США). Пермеабиллизацию проводили погружением в 0.3%-ный раствор Triton X-100 (T8787, “Sigma-Aldrich”) на 30 мин. Неспецифическое связывание блокировали 5%-ной нормальной ослиной сывороткой (“Sigma-Aldrich”) и 0.1%-ным Triton X-100 в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубацию с антителами anti-Calreticulin [FMC 75] (1 : 1000, ab22683, “Abcam”) и anti-CDNF (1 : 1000; “Icosagen AS”, Эстония), разведённым в PBS, проводили в течение ночи при 4 °С. После промывания в PBS наносили вторичные антитела с флуоресцентными метками на 1 ч при комнатной температуре (1 : 400, #711-545-152 Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG и 1 : 200 #A-21203 Donkey anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594). Ядра клеток окрашивали раствором

бис-бензимида (краситель Hoechst 33258 (5 мкг/мл в PBS); “Sigma-Aldrich”). Срезы помещали в монтирующую среду (Fluoromount G; “Associates Biotechnology Southern”, США) с последующим микроскопическим анализом с использованием конфокального микроскопа Olympus IX83P2ZF (“Olympus Corp.”, Япония).

Водный лабиринт Морриса. Установка для теста представляла собой круглый бассейн диаметром 200 см. Бассейн заполняли водой (температура – 25 °С) и добавляли сухое молоко для непрозрачности. Стеклянная платформа диаметром 170 см² помещалась в геометрический центр нижнего правого сектора так, что она оказывалась на 0.5 см ниже уровня воды, становясь невидимой для животных. На ближайшую к платформе стену бассейна клеили чёрный прямоугольник, который служил визуальным ориентиром.

Обучение животных проводилось в течение 5 дней, по 3 тестирования каждый раз. При обучении животное помещали в центр одного из секторов, кроме целевого, и в течение 60 секунд оно искало платформу. Вне зависимости от того, была найдена платформа или нет, в конце каждого тестирования крысу помещали на платформу и удерживали (если требовалось) там в течение 15 секунд. Все раунды тестирования фиксировались при помощи веб-камеры для последующего анализа

латентного времени нахождения платформы (с). На шестой день проводили контрольное тестирование для проверки качества формирования пространственной памяти у животных. Для этого платформу убрали, животное помещали в центр бассейна и фиксировали его перемещение в течение 60 с. Оценивали время нахождения в целевом секторе (%), затем считали среднее по трём тестированиям. Статистически значимое превышение времени нахождения в целевом секторе над случайным (25%) свидетельствовало о том, что крыса помнит расположение платформы.

Статистическая обработка результатов. Для выявления и исключения выбросов из выборки использовался метод ROUT ($Q = 0.05$). Распределение данных контролировали на нормальность с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Данные первого этапа (межлинейные различия и возрастная динамика) анализировались с помощью двухфакторного анализа ANOVA с последующим апостериорным анализом по Фишеру, результаты молекулярных методик второго этапа исследования обрабатывались с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни, в зависимости от распределения. В отношении динамических показателей поведения производился анализ повторных измерений с помощью

смешанной линейной модели с последующим апостериорным анализом по Фишеру. Все значения представлены как $m \pm SEM$. Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism 9.1.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Межлинейные различия в экспрессии CDNF.

При сравнении крыс Вистар и OXYS в трёх временных точках отмечается влияние на экспрессию *Cdnf* как возраста, так и линии ($F_{(2, 29)} = 7.383$; $p = 0.0026$ и $F_{(1, 29)} = 20.36$; $p < 0.0001$, соответственно; рис. 2а), в то же время взаимодействия этих факторов достоверно не выявлено ($F_{(2, 29)} = 3.173$; $p = 0.06$). При апостериорном анализе нами было выявлено снижение уровня транскриптов *Cdnf* у крыс OXYS по сравнению с Вистар начиная с 3.5-месячного возраста ($p = 0.03$) и сохраняющееся в возрасте 18 месяцев ($p < 0.0001$).

На уровень белка CDNF повлияла принадлежность к линии ($F_{(1, 28)} = 15.89$; $p = 0.0004$; рис. 2б), но не возраст ($F_{(2, 28)} = 2.017$; $p > 0.05$). При апостериорном анализе нами было выявлено снижение уровня CDNF у крыс OXYS по сравнению с Вистар во всех возрастных точках ($p = 0.0492$; $p = 0.0317$;

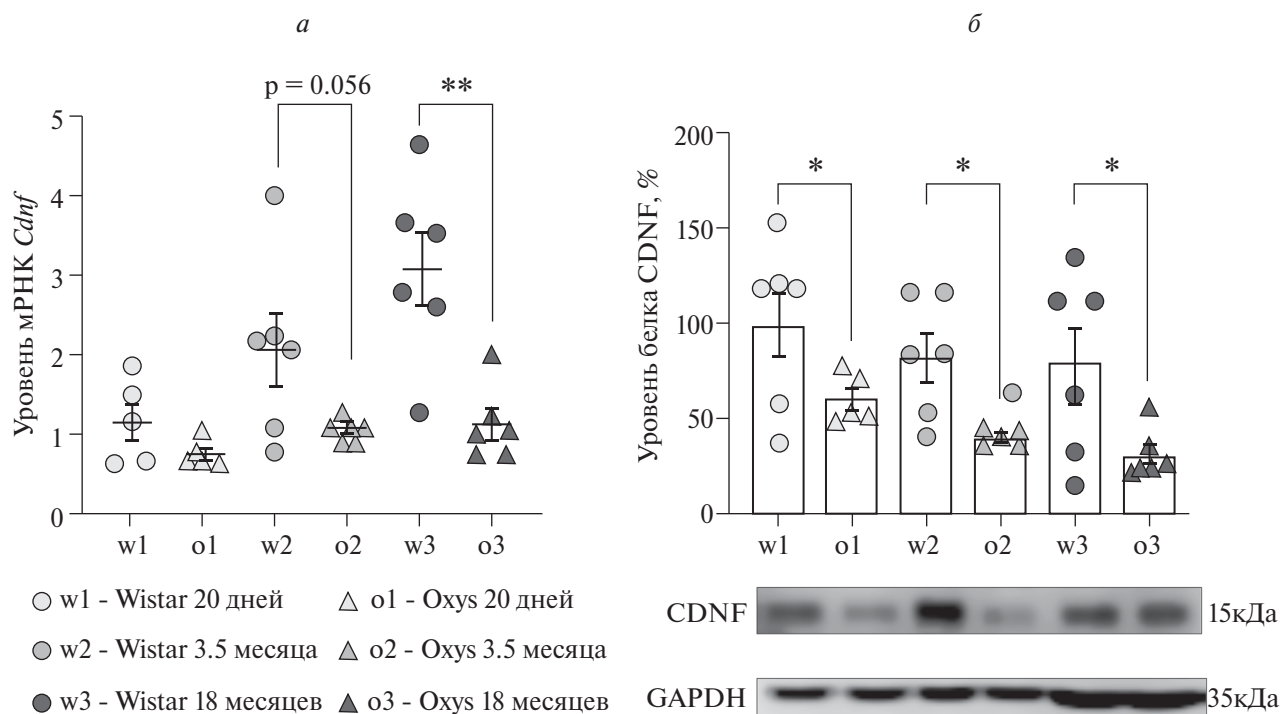


Рис. 2. Экспрессия CDNF в гиппокампе крыс линии OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3.5 месяца и 18 месяцев: а - уровень мРНК гена *Cdnf*; б - количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка CDNF и результат иммуноблота на мембране. Число копий кДНК гена отнесено на 100 копий кДНК *rPol2a*. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ — по сравнению с контролем.

$p = 0.0146$). Взаимодействия факторов линия \times возраст не выявлено ($F_{(2, 28)} = 0.048$; $p > 0.05$).

Сверхэкспрессия CDNF. Так как на уровне мРНК дефицит регистрировался в возрасте 3.5 месяцев, нами была выбрана эта возрастная точка для индукции сверхэкспрессии. Спустя 15 месяцев было установлено, что интрагиппокампальная инъекция AAV-CDNF вызвала повышение уровня мРНК *Cdnf* более чем в двенадцать раз ($t = 4.571$; $df = 17$; $p < 0.001$; рис. 3б).

Вестерн-блот-анализ также показал, что уровень белка CDNF в гиппокампе экспериментальных животных значительно вырос ($t = 2.59$; $df = 14$; $p = 0.0215$; рис. 3в). Таким образом, была достигнута сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе

экспериментальных животных, что также было подтверждено данными микроскопии. По результатам иммуногистохимического окрашивания с кальретикулином, проведённому на срезах гиппокампа, было обнаружено, что экспрессируемый CDNF преимущественно локализуется в ЭПР (рис. 3а).

Влияние сверхэкспрессии CDNF на память и пространственное обучение. Тестирование в водном лабиринте Морриса показало, что на латентное время нахождения платформы не повлиял день тестирования ($F_{(4, 56)} = 1.55$; $p > 0.05$), но повлияла принадлежность животного к опытной или контрольной группе ($F_{(1, 15)} = 12.7$; $p < 0.001$; рис. 4а). При апостериорном сравнении выявлено достоверное различие между группами AAV-EGFP и AAV-CDNF в первый и пятый дни тестирования ($p = 0.026$

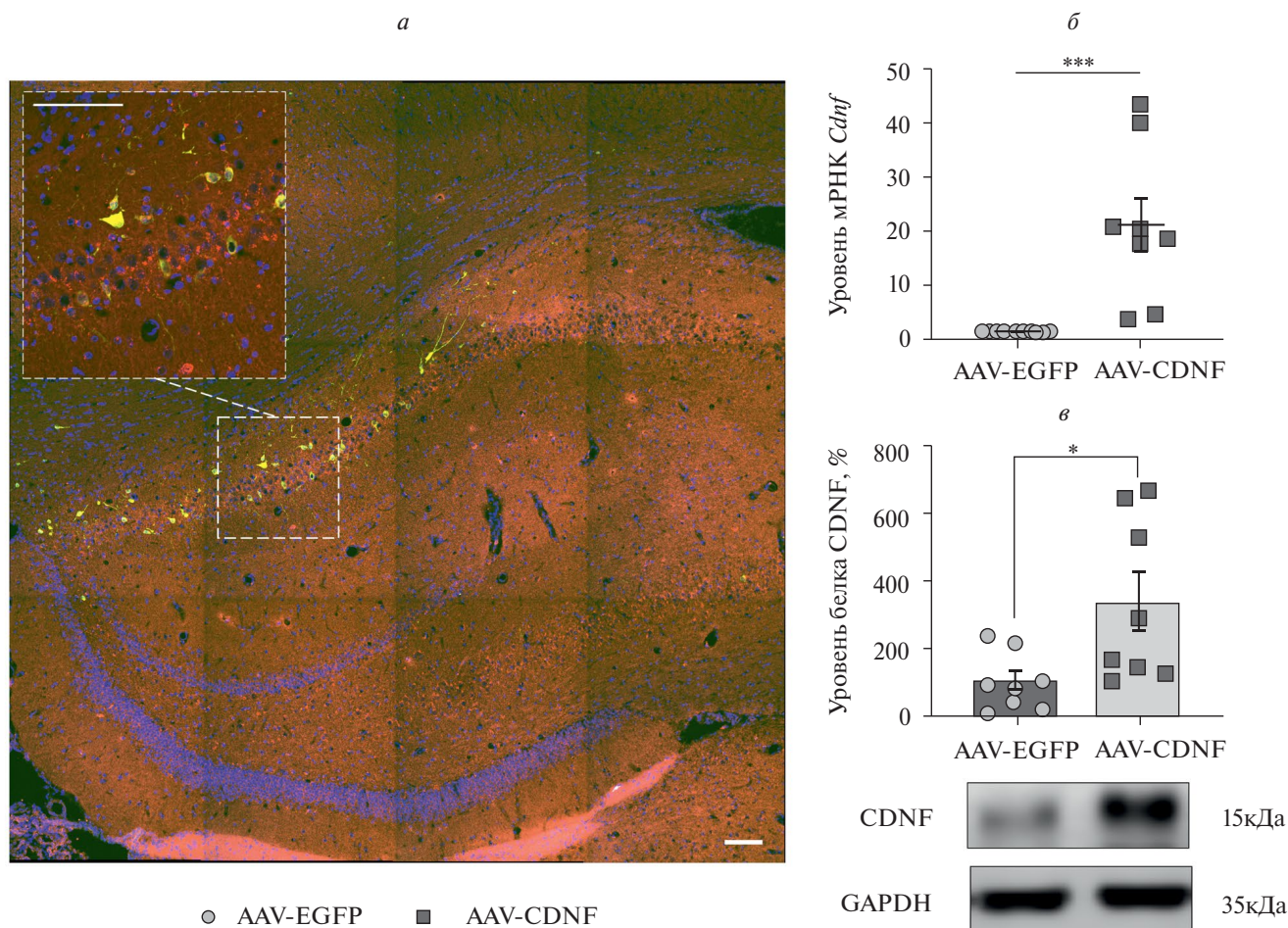


Рис. 3. Сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе крыс OXYS. а – совместная локализация кальретикулина и транслированного CDNF в CA1-области гиппокампа (масштабная линейка – 100 мкм). Срезы гиппокампа подвергали иммуногистохимическому окрашиванию для обнаружения CDNF (зелёный) и кальретикулина (красный) с последующей конфокальной микроскопией. Ядра показаны синим цветом. Колокализация показана жёлтым цветом. б – уровень мРНК гена *Cdnf*; в – количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка CDNF и результат иммуноблота на мембране. Число копий кДНК гена отнесено на 100 копий кДНК *rPol2a*. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH. * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$ – по сравнению с контролем.

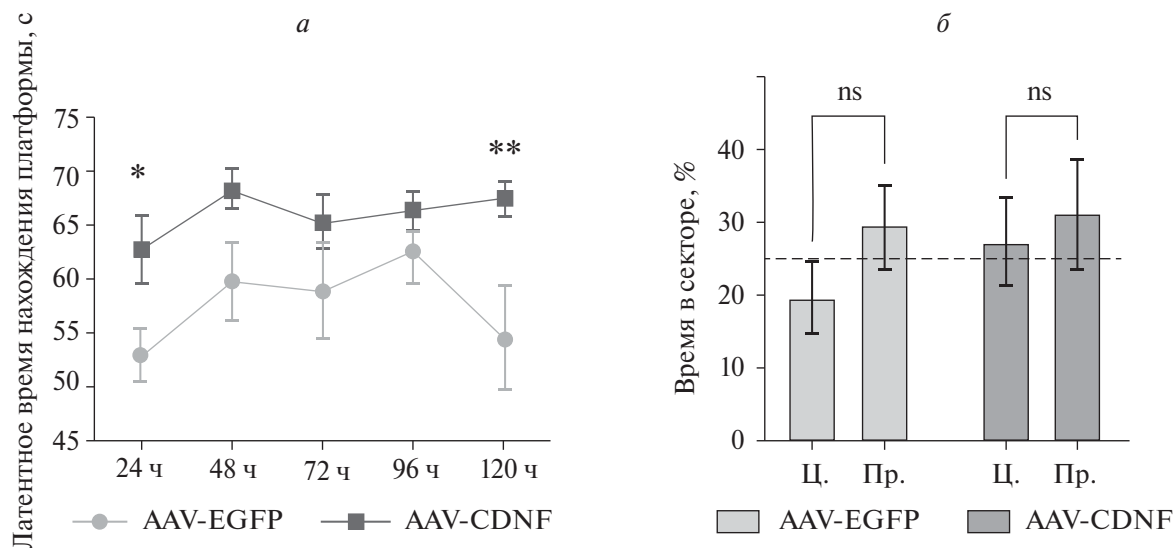


Рис. 4. *а* – Латентное время нахождения платформы в тесте “водный лабиринт Морриса” для животных со сверхэкспрессией CDNF и животных контрольной группы; *б* – Контрольное тестирование для проверки качества формирования пространственной памяти. Время (%), проведённое в целевом секторе (Ц.): по сравнению с противоположным сектором (Пр.) и по сравнению с 25%-ной вероятностью случайного нахождения в целевом секторе (обозначено пунктирной линией). ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ – для группы AAV-CDNF по сравнению с AAV-EGFP.

и $p = 0.0066$ соответственно). Взаимодействия факторов не наблюдалось ($F_{(4, 56)} = 0.69$; $p > 0.05$).

В контрольный день тестирования (без платформы) не было выявлено статистически значимого нахождения в целевом секторе по сравнению с противоположным ($F_{(1, 30)} = 1.177$; $p > 0.05$) ни для

животных из группы AAV-CDNF, ни для животных из группы AAV-CDNF ($F_{(1, 30)} = 0.57$; $p > 0.05$; рис. 4б).

При сравнении времени, проведенного в целевом секторе со случайной вероятностью нахождения в секторе (25%) достоверных отличий

Таблица 3. Профиль экспрессии генов UPR в гиппокампе для животных со сверхэкспрессией CDNF (AAV-CDNF) и животных контрольной группы (AAV-EGFP)

Ген	m \pm SEM		p-value	Характеристика гена
	AAV-EGFP	AAV-CDNF		
<i>Atf6</i>	20.78 \pm 0.54	22.93 \pm 0.76	0.0298	Activating Transcription Factor 6 –фактор транскрипции, который активирует гены-мишени UPR
<i>Grp78</i>	185.7 \pm 6.94	184.0 \pm 9.47	0.8815	Белок теплового шока, репрессор UPR
<i>Perk</i>	26.28 \pm 0.9	26.44 \pm 1.18	0.9107	Ингибитор инициации трансляции, активируемый UPR
<i>Ire1α</i>	8.93 \pm 0.24	8.91 \pm 0.42	0.9625	Инозитол-требующая киназа 1 – сенсор UPR
sXbp1	0.058 \pm 0.003	0.056 \pm 0.002	0.5593	X-box binding protein 1 – транскрипционный фактор (активная сплайсированная форма)
uXbp1	1.45 \pm 0.05	1.4 \pm 0.06	0.5705	X-box binding protein 1 – транскрипционный фактор (несплайсированная форма)
sXbp1/uXbp1	0.039 \pm 0.0004	0.04 \pm 0.001	0.2282	Соотношение сплайсированной и несплайсированной форм Xbp

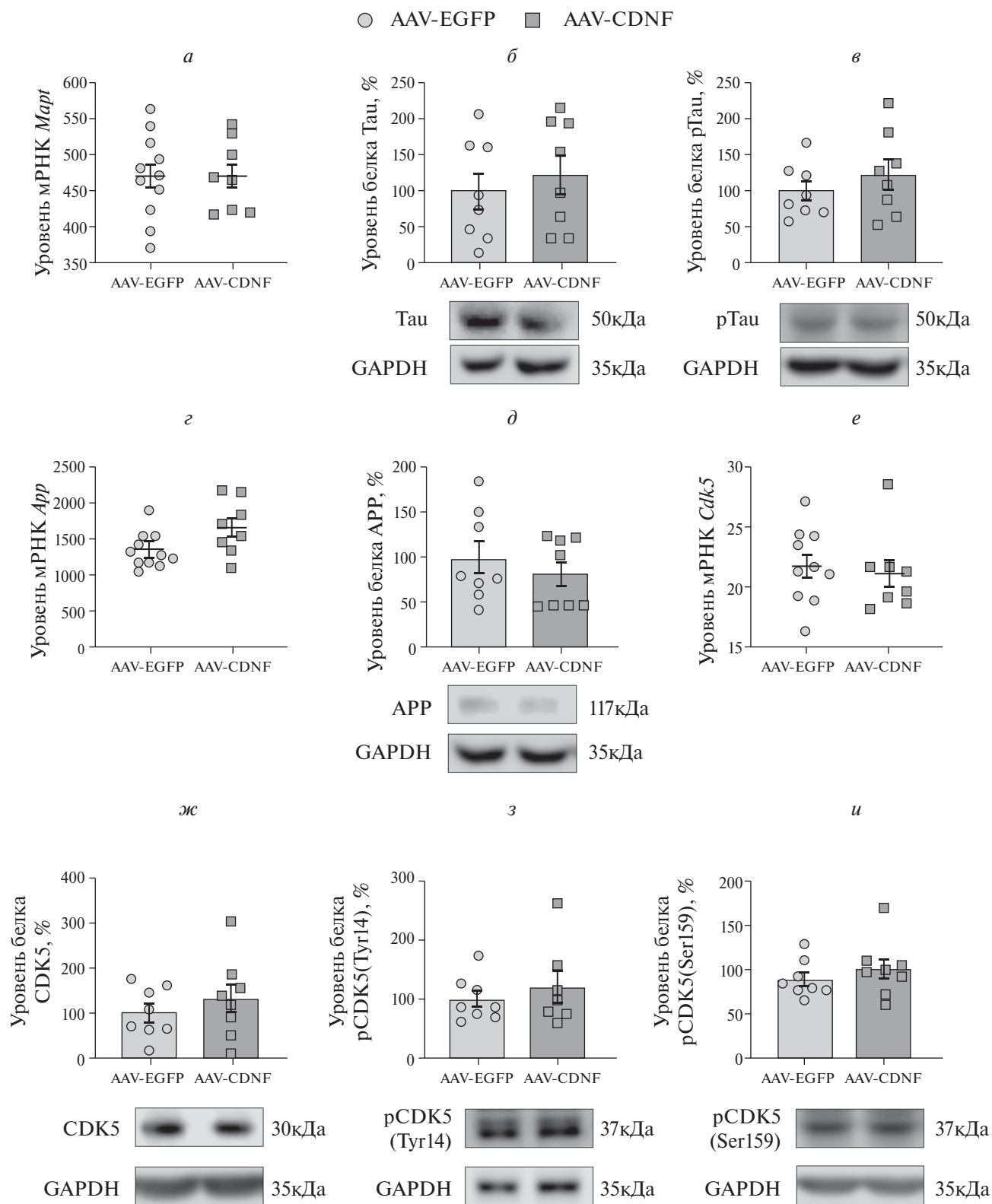


Рис. 5. Экспрессия генов *Mapt* (а), *App* (е), *Cdk5* (е). Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий *rPol2*. Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка, а также результаты иммуноблота на мембранах для TAU (б), pTAU (в), APP (д), CDK5 (ж), pCDK5 (Tyr15) (з), pCDK5(Ser159) (и). Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH.

выявлено не было ($F_{(1, 30)} = 0.1974$; $p > 0.05$ и $F_{(1, 30)} = 0.9157$; $p > 0.05$), что означает нарушение формирования пространственной памяти у всех экспериментальных животных.

Таким образом, сверхэкспрессия CDNF не оказала положительного эффекта ни на динамику пространственного обучения, ни на память животных.

Эффекты сверхэкспрессии CDNF на экспрессию генов UPR. Так как предположительно положительные эффекты CDNF связаны с его локализацией в ЭПР и участием в реакции UPR, мы проверили уровень экспрессии ключевых генов, вовлеченных в этот процесс (табл. 3).

Достоверное изменение зафиксировано только для *Atf6* ($t = 2.371$, $df = 17$; $p = 0.0298$), его экспрессия была выше в группе AAV-CDNF.

Влияние сверхэкспрессии CDNF на белки-маркеры БА. Также мы оценили экспрессию генов и уровень белка для основных маркерных белков БА. Сверхэкспрессия CDNF не оказала эффекта на экспрессию и уровень Tau-белка (рис. 5а, б) и APP (рис. 5г, д). Для Tau-белка был также оценен уровень фосфорилированной формы (рис. 5в), так как эта модификация, вероятно, является более информативным предиктором агрегации Tau-белка [29].

Кроме того мы измерили экспрессию и уровень белка циклин-зависимой киназы 5 (CDK5; рис. 5е, ж). Её активация (фосфорилирование) вызывает aberrантное гиперфосфорилирование различных субстратов, в том числе APP и Tau, поэтому мы также оценили уровень белка CDK5, фосфорилированного по Tyr15 и Ser159 (рис. 5з, и). Однако, сверхэкспрессия CDNF не оказала влияния на фосфорилирование CDK5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе нами впервые показан дефицит CDNF в гиппокампе у крыс OXYS, что позволяет говорить о более существенных нарушениях баланса НТФ, чем считалось прежде, более того ранее не было показано, что нативный дефицит CDNF связан с каким-либо патологическим фенотипом. На данный момент имеются только косвенные данные, позволяющие предположить, что дефицит CDNF может быть связан с БА: у пациентов с предполагаемым диагнозом БА было показано снижение CDNF в тромбоцитах периферической крови [30]. Однако, значимое снижение CDNF было зафиксировано только для пациентов мужского пола, исследование проводилось на небольшой выборке пациентов, не учитывался прием лекарственных средств, которые могли изменить экспрессию CDNF, в целом нет доказательств, что уровень экспрессии CDNF в тромбоцитах соотносится с его экспрессией в головном мозге. Таким

образом, мы впервые убедительно показали, что дефицит CDNF в головном мозге может сопровождать развитие признаков БА.

Для крыс линии OXYS было показано, что уже в возрасте 3 месяцев наблюдаются накопление белка Aβ и Tau-белка, ухудшение долговременной потенциации, демиелинизация, потеря нейронов гиппокампа и, как результат, выраженные когнитивные нарушения [19]. В период ранней манифестации признаков БА показаны изменения и со стороны нейротрофических факторов. Известно, что в префронтальной коре на раннем этапе развития признаков БА у крыс OXYS нарушается соотношение экспрессии proBDNF/BDNF в направлении незрелой формы белка и снижение фосфорилирования TrkB рецептора, а на более позднем этапе — экспрессия BDNF снижается, но увеличивается как количество, так и частота колокализации proBDNF и p75NTR рецептора, что указывает на активацию процессов апоптоза [21, 22]. CDNF, в свою очередь, является модулятором путей апоптоза [31], и, как мы показали, его экспрессия существенно снижена начиная с возраста 3 месяцев, а низкий уровень белка наблюдается даже на 20 день постнатального развития. Таким образом, выявленные изменения в уровне белка и mРНК CDNF совпадают с началом манифестации признаков БА у крыс линии OXYS. Именно по этой причине мы решили начать компенсацию дефицита CDNF у трёхмесячных животных с возможностью наблюдения эффектов у старых крыс. Вместе с тем, поскольку CDNF является неклассическим нейротрофическим фактором и существует преимущественно как резидентный белок ЭПР, заманчиво предположить, что его дефицит в ранний период развития может быть одним из предикторов усиления клеточного стресса у крыс OXYS. Однако, данное предположение требует дальнейших исследований.

На сегодняшний день накоплено большое количество данных об участии UPR в патогенезе БА, предполагается, что ослабление адаптивного UPR приводит к пролонгированному стрессу ЭПР, что в свою очередь усиливает каскады, направленные на гибель клеток [32]. В частности, при мутациях в пресенилине 1 (PS1), характерных для семейных случаев БА, подавлялось расщепление ATF6 [33]. Известно, что CDNF оказывает своё влияние преимущественно находясь в ЭПР через регуляцию UPR. При сверхэкспрессии CDNF также локализуется в ЭПР, что было подтверждено нашими результатами иммуногистохимического окрашивания и согласуется с данными литературы [34, 35]. Полученные нами данные демонстрируют, что сверхэкспрессия CDNF не оказала существенного влияния на экспрессию генов UPR: достоверное повышение отмечалось только для *Atf6*. Ранее нами было показано, что при сверхэкспрессии CDNF

в гиппокампе мышей с депрессивно-подобным поведением имеет место активация Ire1-Xbp1-пути — одного из каскадов UPR [34]. Наиболее вероятное объяснение отсутствию эффектов CDNF на экспрессию генов UPR в мозге крыс линии OXYS — временной разрыв между инъекцией вирусного конструкта в возрасте 3 месяцев и забором материала в 18 месяцев. Таким образом, ответ генов UPR мог быть скомпенсирован. Ранее для CDNF было показано уменьшение синаптотоксического действия, вызванного обработкой Аβ нейронов гиппокампа, которое исследователи связывали с ослаблением амилоид-индуцированного стресса ЭПР [18]. В том числе, в вышеупомянутой работе отмечалось изменение экспрессии Grp78, чего в нашем эксперименте зафиксировано не было.

Сверхэкспрессия CDNF не оказала эффекта на процессы накопления Аβ и Тау-белка. Эти данные согласуются с исследованием на мышах линии APP/PS1, также являющейся моделью БА, где было показано отсутствие эффекта на амилоидную нагрузку как от рекомбинантного CDNF, так и от AAV-CDNF [17]. Однако, стоит отметить, что в указанном исследовании CDNF экспрессировался под CMV промотором, т.е. во всех типах клеток, что могло значительно повлиять на результат поведенческих тестов. Однако нами недавно показано, что сверхэкспрессия CDNF в нейронах также улучшает динамику пространственного обучения на мышах с депрессивно-подобным поведением [34]. Таким образом, можно заключить, что эффекты CDNF могут зависеть как от клеточной локализации его экспрессии, так и от модели заболевания.

Прогнозировать эффект от сверхэкспрессируемого CDNF достаточно сложно, однако возможно, что его позитивное влияние может быть интенсифицировано при условии секреции во внеклеточную среду.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе нами показан дефицит CDNF в гиппокампе крыс OXYS и предпринята попытка его компенсации. Сверхэкспрессия CDNF не улучшила пространственное обучение и память в возрасте прогрессии признаков БА. При этом не выявлено эффектов CDNF на процессы накопления Аβ и Тау-белка, как и существенного влияния CDNF на экспрессию ключевых генов UPR: сверхэкспрессия CDNF увеличила только экспрессию ATF6 — регулятора одного из путей UPR.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование было осуществлено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения

Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), поддержанного Министерством науки и высшего образования России (уникальный идентификационный номер проекта: RFMEFI62119X0023).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00011). Содержание животных было поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0023.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все экспериментальные процедуры были проведены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the Eighth Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council © 2020 National Academy of Sciences (USA)) и одобрены этическим комитетом ИЦиГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knopman D.S., Amieva H., Petersen R.C., Chételat G., Holtzman D.M., Hyman B.T. et al. // *Nature Reviews Disease Primers*. 2021. V. 7. № 1. P. 33.
2. Appel S.H. // *Annals of Neurology*, John Wiley & Sons. 1981. V. 10. № 6. P. 499–505.
3. J. Allen S., J. Watson J., Dawbarn D. // *Curr Neuropharmacol*. 2011 V. 9. P. 559–73.
4. Pentz R., Iulita M.F., Ducatenzeiler A., Bennett D.A., Cuello A.C. // *Mol Psychiatry*. 2021. V. 26. № 10. P. 6023–37.
5. Claudio Cuello A., Pentz R., Hall H. // *Front Neurosci*. 2019. V. 13. № 2.
6. Du Y., Wu H.T., Qin X.Y., Cao C., Liu Y., Cao Z.Z. et al. // *Journal of Molecular Neuroscience*. 2018. V. 65. P. 289–300.
7. Buchman A.S., Yu L., Boyle P.A., Schneider J.A., De Jager P.L., Bennett D.A. // *Neurology*. 2016. V. 86. P. 735–41.
8. Jiao F., Jiang D., Li Y., Mei J., Wang Q., Li X. // *Cells*. 2022. V. 11. № 20. P. 0–16.
9. Amadoro G., Latina V., Balzamino B.O., Squitti R., Varano M., Calissano P. et al. // *Frontiers in Neuroscience*. 2021. V. 15. P. 1–17.
10. Lennon M.J., Rigney G., Raymont V., Sachdev P. // *Journal of Alzheimer's Disease*. 2021. V. 84. № 2. P. 491–504.
11. Tuszynski M.H., Thal L., Pay M., Salmon D.P., Sang U.H., Bakay R. et al. // *Nat Med*. 2005. V. 11. № 5. P. 551–5.

12. Eriksdotter-Jönghagen M., Linderoth B., Lind G., Aladellie L., Almkvist O., Andreasen N. et al. // *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2012. V. 33. № 1. P. 18–28.
13. Rafii M.S., Tuszyński M.H., Thomas R.G., Barba D., Brewer J.B., Rissman R.A. et al. // *JAMA Neurol*. 2018. V. 75. № 7. P. 834–41.
14. Pakarinen E., Lindholm P. // *Front Psychiatry*. 2023. V. 14.
15. Lõhelaid H., Saarma M., Airavaara M. // *Pharmacol. Ther.* 2024. V. 254. P. 108594.
16. Huttunen H.J., Saarma M. // *Cell Transplantation*. 2019. V. 28. № 4. P. 349–66.
17. Kemppainen S., Lindholm P., Galli E., Lahtinen H.-M.M., Koivisto H., Hämäläinen E. et al. // *Behavioural Brain Research*. 2015. V. 291. P. 1–11.
18. Zhou W., Chang L., Fang Y., Du Z., Li Y., Song Y. et al. // *Neuroscience Letters*. 2016. V. 633. P. 40–6.
19. Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A. et al. // *Cell Cycle*. 2014. V. 13 № 6. P. 898–909.
20. Гуляева Н.В., Бобкова Н.В., Колосова Н.Г., Самохин А.Н., Степаничев М.Ю., Стефанова Н.А. // *Биохимия*. 2017. Т. 82. С. 1427–43.
21. Рудницкая Е.А., Колосова Н.Г., Стефанова Н.А. // *Биохимия*. 2017. Т. 82. С. 460–9.
22. Alsallum M., Kaminskaya Y.P., Tsybko A.S., Kolosova N.G., Naumenko V.S. // *Advances in Gerontology*. 2024. V. 13. № 2. P. 84–93.
23. Rao Y.L., Ganaraja B., Murlimanju B. V., Joy T., Krishnamurthy A., Agrawal A. // *3 Biotech*. 2022. V. 12. № 2. P. 55.
24. Grimm D., Kay M.A., Kleinschmidt J.A. // *Mol Ther*. 2003. V. 7. № 6. P. 839–50.
25. Rodnyy A.Y., Kondaurova E.M., Bazovkina D. V., Kulikova E.A., Ilchibaeva T. V., Kovetskaya A.I. et al. // *J. Neurosci*. 2022. V.100. № 7. P. 1506–23.
26. Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. // *Journal of Neuroscience Methods*. 2005. V. 141. № 1. P. 97–101.
27. Naumenko V.S., Kulikov A. V. // *Molecular Biology*. 2006. V. 40. № 1. P. 30–6.
28. Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. // *Journal of Neuroscience Methods*. 2008. V. 170. № 2. P. 197–203.
29. Wegmann S., Biernat J., Mandelkow E. // *Curr Opin Neurobiol*. 2021. V. 69. P. 131–8.
30. Joshi H., Shah J., Abu-Hijleh F.A., Patel V., Rathbone M., Gabriele S. et al. // *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2022. V. 36. № 3. P. 269–71.
31. Eremin D.V., Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S. // *Biochemistry Moscow*. 2021. V. 86. № 7. P. 852–866.
32. Ajoolahady A., Lindholm D., Ren J., Pratico D. // *Cell Death and Disease*. 2022. V. 13. № 8. P. 1–15.
33. Katayama T., Imaizumi K., Honda A., Yoneda T., Kudo T., Takeda M. et al. // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. V. 276. № 46. P. 43446–43454.
34. Kaminskaya Y.P., Ilchibaeva T.V., Khotskin N.V., Naumenko V.S., Tsybko A.S. // *Biochemistry Moscow*. 2023. V. 88. № 8. P. 1070–91.
35. Eesmaa A., Yu L.-Y.Y., Göös H., Danilova T., Nöges K., Pakarinen E. et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. № 16. P. 9489.

The Development of Signs of Alzheimer's Disease in OXYS Rats is Accompanied by a Decrease in the Expression of Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF), and is not Compensated by Its Overexpression

Ya. P. Kaminskaya¹, T. V. Ilchibaeva¹, T. A. Kozlova¹, N. G. Kolosova¹, V. S. Naumenko¹, and A. S. Tsybko¹

¹Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease leading to senile dementia. It is known that the processes of neurodegeneration are closely related to neurotrophic support. In this work, carried out on a model of AD - the OXYS line of rapidly aging rats, CDNF deficiency in the hippocampus was first identified, and an attempt was made to compensate for it by inducing overexpression using an adeno-associated viral construct. The constructs were introduced into the dorsal hippocampus of rats at the age of three months. 15 months after the introduction of the construct, we showed overexpression of CDNF in the target structure, but did not detect its effect on the learning and memory of animals in the Morris water maze, as well as on the accumulation of A β and Tau protein and the expression of genes involved in the unfolded protein response (UPR).

Keywords: neurotrophic factors, cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF), OXYS rats, Alzheimer's disease

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК: 591.18 612.825

ДВИГАТЕЛЬНАЯ РАЗГРУЗКА ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ВЫЗЫВАЕТ АПОПТОЗ И АУТОФАГИЮ, НО НЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЮ В ГИППОКАМПЕ КРЫС

© 2024 г. Е. А. Олейник^{1, 3, #}, А. С. Березовская^{1, #}, А. А. Куликов¹, С. А. Тыганов²,
А. А. Наумова¹, Е. В. Черниговская¹, Б. С. Шенкман², М. В. Глазова^{1, *}

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

²Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

³Institute of Lightweight Design and Structural Biomechanics, TU Wien, Vienna, Austria

*E-mail: mglazova@iephb.ru

Поступила в редакцию 05.06.2024 г.

После доработки 17.07.2024 г.

Принята к публикации 23.07.2024 г.

Хорошо известно, что физическая активность благотворно влияет на функции всего организма, в то время как малоподвижный образ жизни способствует развитию метаболических и других заболеваний и может привести к снижению когнитивных способностей и повышению риска развития деменции. Когнитивные способности в основном контролируются гиппокампом, а нейродегенерация гиппокампа напрямую коррелирует с прогрессированием деменции. Двигательная разгрузка задних конечностей, или антиортостатическое вывешивание, является широко используемым методом имитации воздействия микрогравитации у грызунов и может быть использована в качестве модели ограничения подвижности, поскольку одним из основных факторов вывешивания является истощение мышц. Кроме того, у грызунов наблюдается ухудшение обучения и памяти после длительного пребывания в условиях вывешивания. В данной работе мы исследовали, влияет ли вывешивание на выживание или гибель клеток гиппокампа. Наши данные показали, что после 3-дневного вывешивания в гиппокампе активируются как аутофагия, так и апоптоз, о чем свидетельствуют увеличение количества клеток, ко-экспрессирующих катепсин D и LC3b, и активация каспаз 3 и 9 соответственно. Наши данные свидетельствуют о том, что вывешивание не оказывает воздействия, приводящего к нейродегенерации, в течение 14 дней. Более того, наши результаты также показали, что активация аутофагии при кратковременном воздействии вывешивания имеет защитный эффект, поскольку мы не наблюдали потери или повреждения клеток.

Ключевые слова: антиортостатическое вывешивание, гиппокамп, апоптоз, аутофагия, расщеплённая каспаза 3, расщеплённая каспаза 9, Bcl-2, p62, катепсин D, LC3b

DOI: 10.31857/S1027813324040096, EDN: EGJUFJ

ВВЕДЕНИЕ

Физическая активность — хорошо известный фактор, оказывающий благотворное влияние на функции всего организма, включая кости, мышцы, сердечно-сосудистую систему и т.д. Физические упражнения повышают экспрессию нейротрофинов в ЦНС и, таким образом, улучшают функции коры головного мозга и уровень нейрогенеза [1–3]. С другой стороны, нейротрофины/миокины вырабатываются мышцами, и их экспрессия резко повышается во время мышечной нагрузки [4, 5].

Согласно гипотезе о положительном влиянии упражнений на работу мозга, выделяемые мышцами соединения попадают в мозг и впоследствии активируют пути передачи сигнала, запускающие пластичность [6]. Действительно, один из основных нейротрофинов — нейротрофический фактор мозга (BDNF) — способен преодолевать гематоэнцефалический барьер [7], а концентрация BDNF в циркулирующей крови прямо коррелирует с уровнем BDNF в мозге [8].

Напротив, малоподвижный образ жизни способствует развитию таких заболеваний, как остеопороз, диабет 2-го типа, сердечно-сосудистые и другие заболевания [9], а также может привести

Равный вклад авторов в работу.

к снижению когнитивных способностей и повышению риска развития деменции [10, 11]. Еще одним фактором, связанным со снижением когнитивных способностей, является госпитализация, которая даже в некритических случаях сочетает в себе такие стрессовые воздействия, как изоляция и снижение физической активности наряду с самой болезнью [12]. Длительная гиподинамия у лежачих больных и у пожилых людей также приводит к снижению когнитивных способностей [13]. Космический полет представляет собой уникальный тип стрессового фактора, который сочетает в себе психологический стресс от изоляции в небольшом пространстве и эффекты микрогравитации, радиации, изменения циркадных ритмов и многого другого [14]. Существует множество документально подтвержденных когнитивных симптомов, связанных с космическими полетами, среди которых проблемы с памятью, обучением, принятием решений и вниманием [14, 15]. Данные наземных экспериментов с разгрузкой задних конечностей (антиортостатическим вывешиванием), которая широко используется для имитации воздействия микрогравитации у грызунов, также продемонстрировали снижение способности к обучению и памяти [16]. Экспериментальная модель вывешивания сочетает в себе различные факторы, такие как изоляция и атрофия мышц, а также смещение спинномозговой жидкости к голове [17, 18]. Первые несколько дней вывешивания также сопровождаются повышением уровня кортикостерона, что указывает на острый стресс [17, 19]. С другой стороны, метод вывешивания может быть использован в качестве модели ограничения подвижности, поскольку одним из основных факторов является значительное снижение мышечной нагрузки задних конечностей и снижение двигательной активности.

Хорошо известно, что когнитивная деятельность в основном контролируется гиппокампом [20], а нейродегенерация гиппокампа напрямую коррелирует с прогрессированием деменции [21]. Соответственно, изменения в работе гиппокампа, вызванные реальной или моделируемой микрогравитацией, могут повлиять на когнитивные способности. Несмотря на то, что эта область в основном не изучена, некоторые опубликованные данные продемонстрировали различные изменения в основных нейротрансмиттерных системах гиппокампа, глутамате и ГАМК, увеличение окислительного стресса и снижение нейрогенеза [16, 22–26]. Нарушение работы клеток гиппокампа может вызывать эксайтотоксичность и последующую гибель нейронов путем апоптоза или, напротив, негативные факторы могут активировать защитные механизмы, такие как аутофагия.

Гибель нейронов может происходить различными путями, среди которых наиболее распространенным является апоптоз. Напротив, аутофагия

играет важную роль в клеточном гомеостазе, очищая и перерабатывая неиспользованные или разрушенные белки и органеллы. Однако аутофагия, несмотря на свою защитную роль, может также вызывать гибель клеток [27]. Гибель нейронов в результате апоптоза или аутофагии, а также сама аутофагия, как нейропротекторный фактор, связаны со стрессом, травмами, старением, неврологическими и нейродегенеративными заболеваниями [28–30]. Кроме того, апоптоз и аутофагия тесно связаны между собой. Ингибирование аутофагии усиливает апоптоз, и, в свою очередь, активация апоптоза может активировать аутофагию для защиты клеток [27].

В настоящей работе мы исследовали, влияет ли вывешивание на выживание или гибель клеток гиппокампа. Ранее мы продемонстрировали активацию Akt-пути в гиппокампе после 3-дневного вывешивания, что означает активацию механизмов выживания клеток [26] и свидетельствует о том, что первые дни вывешивания являются своего рода повреждающим фактором, который может активировать нейропротекцию или вызвать гибель клеток. В данном исследовании мы проанализировали динамические изменения апоптоза и аутофагии в гиппокампе крыс в разные сроки вывешивания, начиная с первого дня и до двух недель. Наши данные продемонстрировали, что кратковременное воздействие приводило к активации аутофагии, в то время как более длительное воздействие не стимулировало ни апоптоз, ни аутофагию.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В эксперименте использовали 40 взрослых крыс-самцов линии Вистар (130–160 г), рандомизация не проводилась. Крысы были получены из сертифицированного питомника лабораторных животных Института биоорганической химии РАН (г. Пущино, Московская область) и содержались в индивидуальных клетках при свето-темновом цикле 12/12 со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры с использованием животных проводились в соответствии с рекомендациями Федерации ассоциаций по изучению лабораторных животных и были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН.

Крысы были разделены на 5 групп: 1) группа С ($n = 8$) – контроль вивария; 2) группа 1НУ ($n = 8$) – 1-дневная разгрузка задней конечности; 3) группа 3НУ ($n = 8$) – 3-дневная разгрузка задней конечности; 4) группа 7НУ ($n = 8$) – 7-дневная разгрузка задней конечности; 5) группа 14НУ ($n = 8$) – 14-дневная разгрузка задней конечности.

За всеми экспериментальными крысами наблюдали три раза в день, следя, чтобы они не чувствовали боли или страдания. По окончании

эксперимента крыс анестезировали внутривенной инъекцией водного раствора трибромэтанола (240 мг/кг; # T48402, Sigma-Aldrich) и декапитировали. Мозг 4 крыс из каждой группы фиксировали в 4% параформальдегиде для иммуногистохимического исследования. Гиппокампы остальных крыс гомогенизированы для вестерн-блот анализа ($n = 4$ для каждой группы).

Вестерн-блот анализ. Каждый выделенный гиппокамп взвешивали и гомогенизировали отдельно в 1.5 мл пробирке с помощью ручного гомогенизатора (# BT704, BT Lab Systems). Ткани были гомогенизированы в 10-кратном объеме лизисного буфера (20mM Tris, pH 7.5; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100) с добавлением протеазных ингибиторов (#4693116001, Sigma-Aldrich) и фосфатазных ингибиторов (#4906837001, Sigma-Aldrich). Общее количество белка определяли с помощью набора Bio-Rad (bovine serum albumin standard, #5000002, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Равные количества белка (15 mg на линию) смешивали в равном объеме 3-кратного буфера для образцов Laemmli (4% SDS, 10% б-меркапто, 20% глицерина, 0.125 M Tris, 0.004% бромфенолового синего; pH 6.8), денатурировали при 95°C в течение 5 мин и разделяли на 10% или 12% акриламидных гелях с помощью Mini-PROTEAN tetra Handcast System (Bio-Rad). Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (размер пор — 0.22 μ m; #sc-3718, Santa Cruz). Мембраны инкубировали в 3% обезжиренном коровьем молоке в Трис-буфере (0.1% Tween 20, 0.2 mM Tris, 137 mM NaCl) в течение 30 минут, а затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами против расщепленных каспаз 3 (1 : 1000; #9661, Cell Signaling) и 9 (1 : 1000; #GTX86912, GeneTex), Bcl-2 (1 : 500; sc-7382, Santa Cruz), беклина-1 (1 : 500; #PD017, MBL), p62 (1 : 4000; #NBP1-48320, Novus), p53 (1:1000; #sc-98, Santa Cruz) или актина (1 : 1000; #ab3280, Abcam). Затем мембраны инкубировали со вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика (1 : 80000; #A0545, Sigma-Aldrich) или мыши (1 : 80000; #A9044, Sigma-Aldrich), после чего проводили хемилюминесцентную детекцию с помощью субстрата SuperSignal@West Dura Extended Duration Substrate (#34075, ThermoFisher Scientific). Сигналы фиксировали с помощью ChemiDoc MP Imaging System (#12003154, Bio-Rad) и анализировали оптическую плотность специфических бэндов с помощью программы ImageJ. Сигнал каждого из белков интереса нормировали на сигнал актина.

Иммуногистохимия и морфологический анализ. Гистологические срезы (10 mm) гиппокампа тщательно промывали в PBS и после инкубации в 5% нормальной козьей сыворотке инкубировали в течение ночи при комнатной температуре с первичными антителами к катепсину D (1 : 500; #PB9048,

Boster Biological Technology) и LC3b (1 : 400; #83506, Cell Signaling). Затем срезы промывали, инкубировали с вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика (1 : 1000; AlexaFluor488 #A-11008, Invitrogen) или мыши (1 : 1000; AlexaFluor568; #A-11011, Invitrogen) с DAPI (1 : 2000; #D9542, Sigma-Aldrich) и заключали в мовиол. Дополнительно проводили реакции без первичных антител, чтобы убедиться в специфичности наблюдаемого окрашивания.

Для определения количества клеток в CA3c и гранулярном слое зубчатой извилины (DG) гиппокамп окрашивали метиленовым синим.

Анализ срезов. Анализ срезов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000B (Leica Microsystems GmbH) и микроскопа Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Для анализа отбирали каждый 15-й срез, таким образом, для каждого животного анализировали пять срезов исследуемой зоны на каждое окрашивание. Обработка срезов в каждом эксперименте проводилась в стандартных условиях, т.е. контрольные и опытные группы в каждом эксперименте обрабатывались одновременно. Для проверки специфичности иммуноочечения повторяли тот же протокол, но без добавления первичных антител, что не привело к появлению окрашивания. Анализ изображений проводился с использованием программы ImageJ (версия 6.0.). Подсчитывали общее количество окрашенных метиленовым синим и иммунопозитивных по катепсину D+LC3b клеток в пирамидальных клетках зоны CA3c гиппокампа, в слое гранулярных клеток DG и в хилусе на 10000 mm^2 .

Статистический анализ. Расчет размера выборки не проводился, но для иммуногистохимического и вестерн-блот анализа было взято по 4 крысы на группу для достижения статистической значимости с помощью непараметрического теста Крускала—Уоллиса.

Статистический анализ проводился с помощью непараметрического теста Крускала—Уоллиса с использованием GraphPad Prism 8.2.1. Значения считались статистически значимыми при $p < 0.05$. На всех графиках значения выражены как медиана с интерквартильным интервалом для гистологического и иммунофлуоресцентного окрашивания, а также вестерн-блот анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первоначально мы проанализировали, были ли повреждены клетки гиппокампа во время вывешивания. Гистохимическое окрашивание метиленовым синим не выявило никаких изменений в морфологии клеток, таких как появление пикнотических клеток (рис. 1а, 2). Более того, подсчет клеток в гиппокампальной области CA3c и в гранулярном слое DG не выявил изменений в количестве

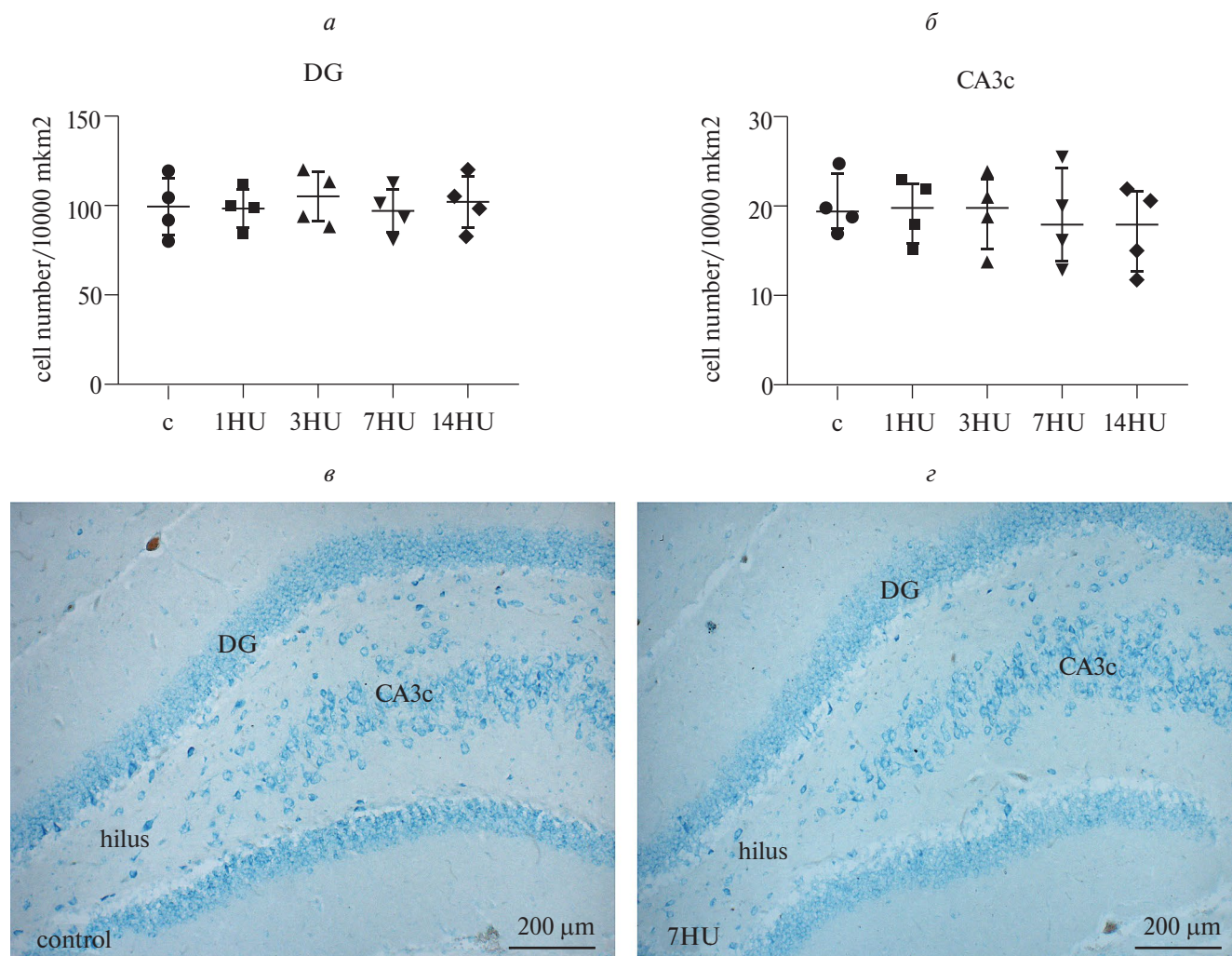


Рис. 1. Число клеток в зубчатой извилине и CA3c не изменилось в процессе вывешивания. Количество клеток подсчитывали в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) (а) и в CA3c (б) после 1 (1HU), 3 (3HU), 7 (7HU) и 14 (14HU) дней вывешивания на 10000 mm². Данные представлены как медиана ± интерквартильный интервал. в, г - репрезентативные изображения гиппокампов контрольных крыс (в) и крыс после 7-дневного вывешивания (7HU), окрашенных метиленовым синим (г). DG - гранулярный слой зубчатой извилины; CA3c - клетки поля CA3c.

клеток (рис. 1а, б). Эти данные указывают на то, что вывешивание в течение 14 дней не оказывает повреждающего воздействия, приводящего к нейродегенерации.

Согласно нашим предыдущим данным [26], в гиппокампе крыс на 3-й день вывешивания происходит активация Akt-зависимого пути выживания, что может свидетельствовать о наличии стрессовых стимулов для клеток. Соответственно, мы проанализировали экспрессию белков, связанных с апоптозом. Полученные нами данные продемонстрировали повышение уровня расщеплённых (активных) каспаз 3 и 9 после 3-дневного вывешивания (рис. 2а, б, г), что свидетельствовало об активации апоптоза и сопровождалось снижением уровня антиапоптотического белка Bcl-2 (рис. 2в, г),

однако эти изменения нормализовались при более длительном воздействии (рис. 2). В то же время экспрессия проапоптотического белка p53 не изменялась (данные не показаны).

Поскольку были обнаружены некоторые признаки активации апоптоза, мы продолжили изучение механизмов выживания клеток и оценили маркеры аутофагии. Вестерн-блот анализ показал снижение p62 и беклина-1 на 3 сутки вывешивания (рис. 3а–в), что указывало на активацию аутофагии. Чтобы уточнить, где именно в гиппокампе происходит аутофагия, мы провели иммунофлуоресцентный анализ и оценили ко-локализацию катепсина D, который в основном контролирует деградацию белков в аутофагосомах, и LC3b, который является маркером аутофагосом. Полученные

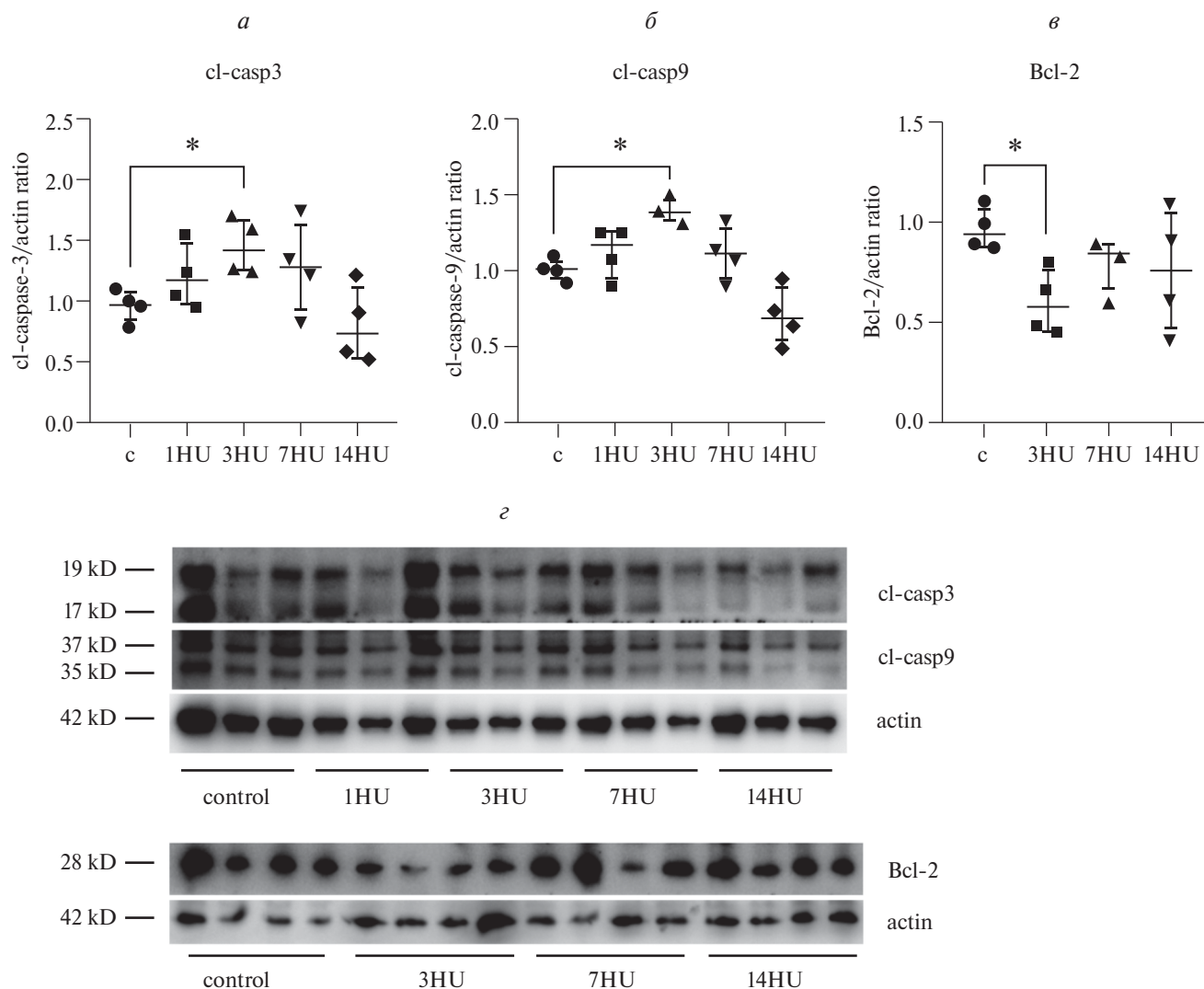


Рис. 2. Трёхдневное вывешивание привело к изменениям белков, связанных с апоптозом. Вестерн-блоттинг выявил значительное увеличение уровня расщеплённых каспаз 3 (cl-casp3) (а) и 9 (cl-casp9) (б) в гиппокампе после 3-дневного вывешивания. Напротив, уровень Bcl-2 после 3-дневного вывешивания был снижен (в). Данные представлены в условных единицах как медиана \pm интерквартильный интервал. * – $p < 0.05$. з – репрезентативные иммуноблоты расщепленных каспаз 3 (cl-casp3) и 9 (cl-casp9), Bcl-2 и актина (actin). Для анализа активных каспаз 3 и 9 использовали бэнды 17 и 35 кДа соответственно.

данные показали увеличение количества катепсин D+LC3b позитивных клеток в хилусе и СА3с после 1-го и 3-го дней вывешивания (Hilus: c vs 1HU $p < 0.0001$; c vs 3HU $p = 0.0006$. СА4: c vs 1HU $p = 0.0286$; c vs 3HU $p = 0.0044$) (рис. 3г, д, ж, з). В гранулярном слое DG количество катепсин D/LC3b-позитивных клеток не изменялось на всех анализируемых временных точках (рис. 3е, ж, з).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы продемонстрировали значительную активацию аутофагии после кратковременного вывешивания, что подтверждается

снижением p62 и появлением катепсин D/LC3b позитивных клеток в DG. p62 – хорошо известный важный игрок аутофагии, и, как было показано, экспрессия p62 снижается за счёт интенсивного лизиса содержимого аутофагосом [31]. LC3b – это белок, который необходим для формирования аутофагосомной мембраны, захвата мишени для деградации и слияния аутофагосом с лизосомой, поэтому экспрессия LC3b отражает аутофагическую активность [32]. КатепсинD является одним из основных лизосомальных ферментов [33], и, следовательно, совместная локализация катепсина D и LC3b подтверждает слияние аутофагосом с лизосомами и активацию аутофагии в клетках.

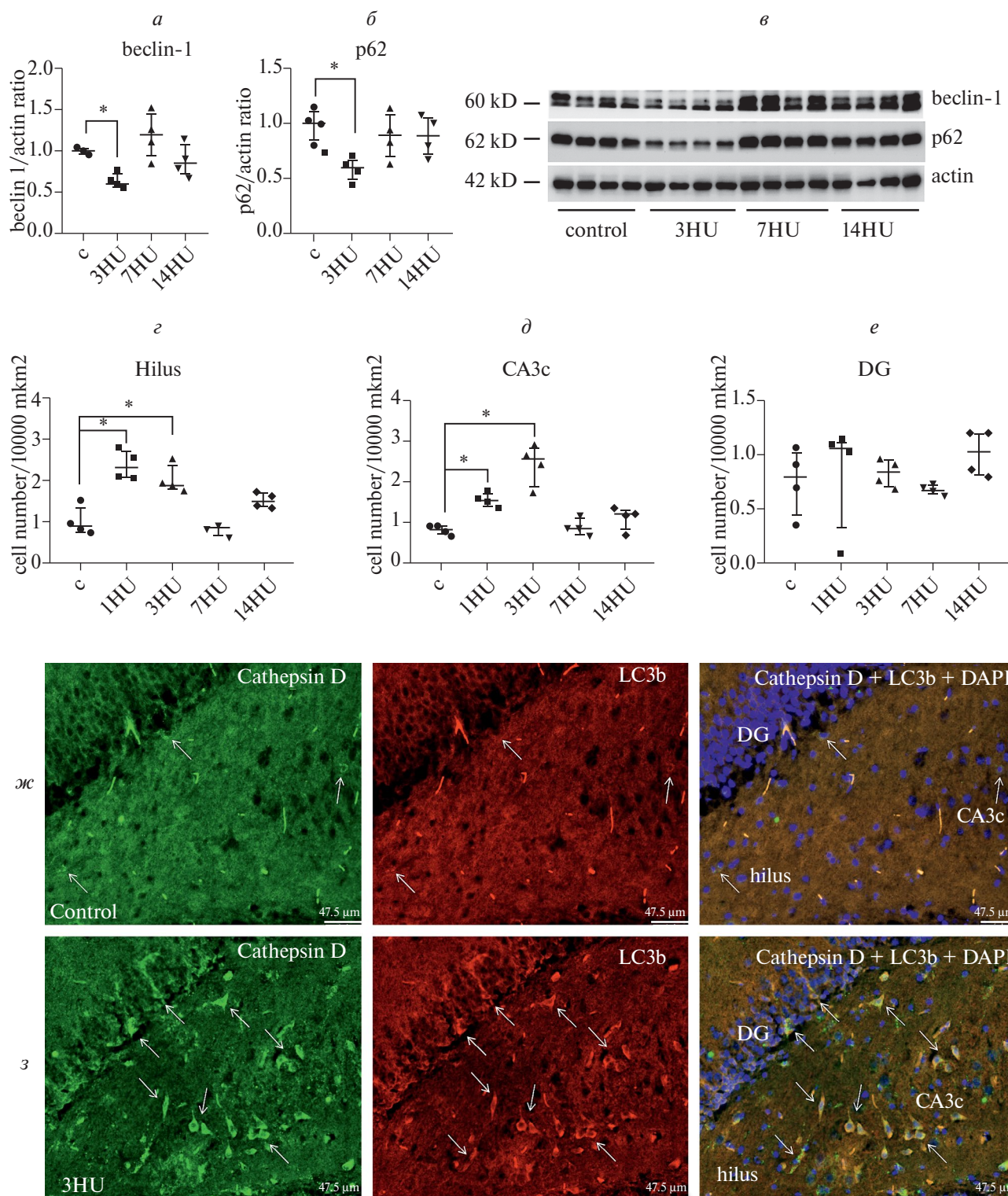


Рис. 3. Аутофагия активировалась в хилусе и СА3с после кратковременного вывешивания. *а, б* – Вестерн-блот анализ показал снижение экспрессии беклина-1 (beclin-1, *а*) и p62 (*б*) в гиппокампе. *в* – репрезентативные иммуноблоты беклина-1 (beclin-1), p62 и актина (actin). *г-е* – оценка количества катепсин D- (cathepsin D, зеленый) и LC3b- (красный) позитивных клеток в хилусе (*г*), СА3с (*д*) и гранулярном слое DG (DG). Данные представлены в виде среднего количества клеток на 10000 μm^2 в виде медианы \pm интерквартильный интервал. * – $p < 0.05$. *ж, з* – репрезентативные изображения гиппокампа контрольных (*ж*) крыс и (*з*) крыс после 3-дневного вывешивания (3HU). Стрелки указывают на катепсин D+LC3b позитивные клетки.

Снижение уровня беклина-1 на первый взгляд может выглядеть противоречиво, поскольку было показано, что диссоциация беклина-1 от Bcl-2 инициирует беклин-зависимую аутофагию [34, 35]. Таким образом, с одной стороны, выявленное снижение экспрессии Bcl-2 предположительно может сопутствовать снижению экспрессии беклина-1 и отражать инициацию беклин-независимой аутофагии. С другой стороны, инициация беклин-зависимой аутофагии может происходить непосредственно в начале вывешивания, и мы наблюдаем его деградацию к 3-му дню. Тем не менее, наши результаты показали, что активация аутофагии во время краткосрочной двигательной разгрузки имела защитный эффект, поскольку мы не наблюдали потери или повреждения клеток.

Активация выживания клеток подразумевает наличие некоторых стрессовых стимулов. Действительно, ранее мы показали, что в гиппокампе и миндалинах у крыс после 3-дневного вывешивания, по сравнению с изолированным контролем, повышается уровень стресс-ассоциированных маркеров, таких как глюкокортикоидные рецепторы, индуцибельная NO-синтаза и Fga-1 [19]. В данном случае мы обнаружили, что не только активируются механизмы выживания клеток, но и наблюдается кратковременная активация апоптоза, подтверждающая индуцированный вывешиванием стресс. Действительно, апоптоз и аутофагия тесно связаны и частично оперируют одними и теми же белками для активации или ингибирования друг друга [27]. Например, p53 может инициировать как апоптоз, так и аутофагию [27]. Однако мы не обнаружили активации p53, в то время как инициаторная каспаза 9 и эффекторная каспаза 3 были активированы, что указывает на активацию апоптоза. В свою очередь, Bcl-2 ингибирует не только апоптоз, но и аутофагию путем физического взаимодействия с беклином-1 [27, 34, 35]. Интересно, что участие Bcl-2 в апоптозе или аутофагии зависит от его клеточной локализации: митохондриальный Bcl-2 ингибирует только апоптоз, тогда как в эндоплазматическом ретикулуме Bcl-2 подавляет аутофагию [27]. Поскольку мы не анализировали внутриклеточную локализацию Bcl-2, наблюдаемое снижение общего уровня Bcl-2 в гиппокампе после 3 дней вывешивания предположительно указывало на активацию как апоптоза, так и аутофагии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы продемонстрировали, что в первые дни вывешивания в гиппокампе активируются как аутофагия, так и апоптоз. Однако это не сопровождалось гибелью клеток, что позволяет предположить, что преимущественная активация аутофагии имеет защитный эффект. Мы предположили, что первоначально апоптоз был индуцирован комплексом

стрессовых факторов, вызванных вывешиванием, таких как ограничение подвижности, смещение цереброспинальной жидкости и изоляция, что было выявлено нами и другими исследователями ранее [17–19]. Ранее также было показано, что вывешивание приводит к снижению способности к обучению и памяти у крыс и мышей [16]. Поскольку мы не наблюдали признаков развития нейродегенерации, ослабление когнитивных функций может быть связано со снижением нейрогенеза [23, 25].

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть анализа была выполнена в Научно-исследовательском ресурсном центре № 441590 Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данное исследование было поддержано программами Правительства РФ № 075-00264-24-00 и FMFR-2024-0032.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все процедуры с использованием животных проводились в соответствии с рекомендациями Федерации ассоциаций по изучению лабораторных животных и были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН.

Вклад авторов. Концептуализация, М.В.Г. и Б.С.Ш.; методология, М.В.Г. и Б.С.Ш.; валидация, М.В.Г. и А.А.Н.; формальный анализ, Е.А.О., А.С.Б. и А.А.Н.; исследование, А.С.Б., С.А.Т. и Е.А.О.; обработка данных, Е.И.Ч. и А.А.Н.; визуализация, А.А.К., Е.А.О. и А.С.В.; написание - подготовка первоначального проекта, рецензирование и редактирование, М.В.Г.

Доступность данных. Данные предоставляются по обоснованному запросу ответственному автору.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Herold F, Törpel A, Schega L, Müller N.G. // Eur. Rev. Aging Phys. Act. 2019. V. 16. P. 1–33.
2. Kempermann G. // Eur. J. Neurosci. 2011. V. 33. P. 1018–1024.
3. Liu P.Z., Nusslock R. // Front. Neurosci. 2018. V. 12. P. 1–6.
4. Lee J.H., Jun H.S. // Front. Physiol. 2019. V. 10. P. 1–9.
5. Sakuma K., Yamaguchi A. // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. P. 1–12.

6. Delezie J., Handschin C. // *Front. Neurol.* 2018. Endocrine crosstalk between Skeletal muscle and the brain. V. 9. P. 1–14.
7. Pan W., Banks W.A., Fasold M.B., Bluth J., Kastin A.J. // *Neuropharmacology.* 1998. V. 37. P. 1553–1561.
8. Klein A.B., Williamson R., Santini M.A., Clemmensen C., Ettrup A., Rios M., Knudsen G.M., Aznar S. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2011. V. 14. P. 347–353.
9. Lurati A.R. // *Work Heal. Saf.* 2018. V. 66. P. 285–290.
10. Aichberger M.C., Busch M.A., Reischies F.M., Ströhle A., Heinz A., Rapp M.A. // *GeroPsych: J. Gerontopsychology Geriatr. Psychiatry.* V. 23. P. 7–15.
11. Yan S., Fu W., Wang C., Mao J., Liu B., Zou L., Lv C. // *Transl. Psychiatry.* 2020. V. 10. P. 1–8.
12. Mathews S.B., Arnold S.E., Epperson C.N. // *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 2014. V. 22. P. 465–480.
13. Marusic U., Kavcic V., Pisot R., Goswami N. // *Front. Physiol.* 2019. V. 9. P. 1–6.
14. De la Torre G. // *Life.* 2014. V. 4. P. 281–294.
15. Casler J.G., Cook J.R. // *Int. J. Cogn. Ergon.* 1999. V. 3. P. 351–372.
16. Wang T., Chen H., Lv K., Ji G., Zhang Y., Wang Y., Li Y., Qu L. // *J. Proteomics.* 2017. V. 160. P. 64–73.
17. Morey-Holton E.R., Globus R.K. // *J. Appl. Physiol.* 2002. V. 92. P. 1367–1377.
18. Qaisar R., Karim A., Elmoselhi A.B. // *Acta Physiol.* 2020. V. 228. P. 1–22.
19. Naumova A.A., Oleynik E.A., Grigorieva Y.S., Nikolaeva S.D., Chernigovskaya E.V., Glazova M.V. // *Neurol. Res.* 2023. V. 45. P. 957–968.
20. Lisman J., Buzsáki G., Eichenbaum H., Nadel L., Ranganath C., Redish A.D. // *Nat. Neurosci.* 2017. V. 20. P. 1434–1447.
21. Moodley K.K., Chan D. // *The Hippocampus in Neurodegenerative Disease.* In: *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* / Ed. Szabo K., Hennerici M.G. *Front. Neurol. Neurosci.* 2014. P. 95–108.
22. Zhang Y., Wang Q., Chen H., Liu X., Lv K., Wang T., Wang Y., Ji G., Cao H., Kan G., Li Y., Qu L. // *Biomed. Res. Int.* 2018. V. 2018. P. 1–11.
23. Yasuhara T., Hara K., Maki M., Matsukawa N., Fujino H., Date I., Borlongan C.V. // *Neuroscience.* 2007. V. 149. P. 182–191.
24. Nomura S., Kami K., Kawano F., Oke Y., Nakai N., Ohira T., Fujita R., Terada M., Imaizumi K., Ohira Y. // *2012. Neurosci. Lett.* V. 509. P. 76–81.
25. Berezovskaya A.S., Tyganov S.A., Nikolaeva S.D., Naumova A.A., Shenkman B.S., Glazova M.V. // *Life.* 2021. V. 11. P. 1–8.
26. Berezovskaya A.S., Tyganov S.A., Nikolaeva S.D., Naumova A.A., Merkulyeva N.S., Shenkman B.S., Glazova M.V. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2021. V. 41. P. 1549–1561.
27. Thorburn A. // *Apoptosis.* 2008. V. 13. P. 1–9.
28. Nixon R.A. // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. P. 528–535.
29. Fricker M., Tolkovsky A.M., Borutaite V., Coleman M., Brown G.C. // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98. P. 813–880.
30. Wilson R.S., Leurgans S.E., Boyle P.A., Schneider J.A., Bennett D.A. // *Neurology.* 2010. V. 75. P. 1070–1078.
31. Shin W.H., Park J.H., Chung K.C. // *BMB Rep.* 2020. *Neuronal Cell Death.* 53. P. 56–63.
32. Tanida I., Ueno T., Kominami E. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004. V. 36. P. 2503–2518.
33. Sevelever D., Jiang P., Yen S.H.C. // *Biochemistry.* 2008. V. 47. P. 9678–9687.
34. Vega-Rubín-de-Celis S. // *Biology (Basel).* 2020. V. 9. P. 1–13.
35. Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D. // *2011. Cell. Death Differ.* V. 18. P. 571–580.

Hindlimb Unloading Induces Apoptosis and Autophagy but not Neurodegeneration in the Hippocampus of the Rats

E. A. Oleynik^{1,3}, A. S. Berezovskaya¹, A. A. Kulikov¹, S. A. Tyganov², A. A. Naumova¹,
E. V. Chernigovskaya¹, B. S. Shenkman², and M. V. Glazova¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

²*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

³*Institute of Lightweight Design and Structural Biomechanics, TU Wien, Vienna, Austria*

Physical activity is well known to have a beneficial effect on whole body functions, whereas a sedentary lifestyle contributes to the development of metabolic and other diseases and can lead to cognitive decline and increased risk of dementia. The hippocampus mainly controls cognitive performance and the hippocampal neurodegeneration is directly correlated with dementia progression. Hindlimb unloading (HU) is a widely used method to simulate microgravity in rodents and can be used as a model of mobility

restriction since one of the main factors of HU is muscle disuse. Additionally, rodents show impaired learning and memory after long-term HU. Here, we explored whether HU would affect the survival or death of the hippocampal cells. Our data demonstrated that after 3-day HU, both apoptosis and autophagy were activated in the hippocampus, as evidenced by the activation of caspase 3 and 9 and an increase in the number of Cathepsin D and LC3b double-positive cells correspondently. Our data indicated that HU has no deleterious effects leading to neurodegeneration for up to 14 days. Moreover, our results also showed that the activation of autophagy during short-term HU had a protective effect, as we did not observe any cell loss or damage.

Keywords: hindlimb unloading, hippocampus, apoptosis, autophagy, cleaved-caspase 3, cleaved-caspase 9, Bcl-2, p62, Cathepsin D, LC3b

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК: 612.822.8

МЕЛАНКОРТИНОВАЯ СИСТЕМА МОЗГА КРЫС ЛИНИИ
КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К АУДИОГЕННЫМ СУДОРОГАМ

© 2024 г. И. В. Романова¹ *, А. Л. Михрина², С. И. Ватаев¹

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

²The Hebrew University Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2024 г.

После доработки 30.07.2024 г.

Принята к публикации 01.08.2024 г.

Исследование проведено на самцах 4-месячного возраста крысы линии Крушинского–Молодкиной (КМ), генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам, и не чувствительных к воздействию звука крысах Wistar. У крыс КМ в гипоталамусе с помощью ПЦР в реальном времени выявлено повышение уровня мРНК AgRP (в 4 раза) и меланокортиновых рецепторов MC4R (в 2.4 раза) по сравнению с крысами Wistar. Отличий в уровне мРНК проопиомеланокортина не было выявлено. Результаты иммуногистохимического анализа свидетельствуют о повышенном уровне оптической плотности AgRP(83–132), MC3R и MC4R в структурах гипоталамуса у крыс КМ по сравнению с крысами Wistar. В дорзальном гиппокампе у крыс КМ так же выявлено статистически достоверное увеличение уровня MC3R (методом Вестерн-блоттинга) и MC4R (методом иммуногистохимии) по сравнению с крысами Wistar. Полученные результаты обсуждаются в связи с выявленным дозозависимым блокирующим эффектом SHU9119 – неселективного блокатора MC3R/MC4R на судорожную активность у крыс КМ.

Ключевые слова: гипоталамус, эпилепсия, проопиомеланокортин, меланокортиновые рецепторы, SHU9119

DOI: 10.31857/S1027813324040101, **EDN:** EGGFUM

ВВЕДЕНИЕ

Меланокортиновые пептиды (альфа-, бета- и гамма-MSH, АСТН) образуются из общей молекулы-предшественника pro-opiomelanocortin (POMC) [1, 2]. У млекопитающих в головном мозге самые большие популяции POMC-нейронов локализованы в аркуатном ядре гипоталамуса (arcuate nucleus - ARC) и ядрах одиночного тракта [2], однако POMC-продуцирующие нейроны выявлены в гиппокампе, коре больших полушарий, среднем мозге [3–5]. В головном мозге млекопитающих эффекты меланокортиновых пептидов (прежде всего альфа-MSH) опосредуются в основном меланокортиновыми рецепторами 3-го и 4-го типов (MC3R и MC4R) [3]. В ARC также расположены нейроны, в которых вырабатывается agouti related peptide/agouti gene related protein (AgRP) – эндогенный антагонист MC3R и MC4R [6]. Таким образом, POMC, MC3R, MC4R и AgRP образуют меланокортиновую систему, работа которой зависит от функционирования различных ее компонентов.

Меланокортиновая система гипоталамуса наиболее изучена в связи с ее участием в регуляции пищевого поведения и энергетического баланса организма: показано, что производные POMC и AgRP являются факторами, контролирующими аппетит [7, 8]. Нокаут гена *Mc4r* у мышей приводил к изменению углеводно-жирового обмена и ожирению [9], а химическая блокада MC3R и MC4R – к увеличению потребления пищи и гиперфагии [10]. Известно, что метаболические нарушения, в частности ожирение, часто сопровождаются психическими расстройствами, такими как депрессия и тревожность [11], в связи с чем можно предположить вовлеченность меланокортиновой системы мозга в патогенез этих заболеваний. Данные о том, что меланокортиновая система участвует в регуляции дофаминергической системы мозга [12–16], дисфункция которой отмечается при различных психических расстройствах [17, 18], также свидетельствует в пользу этого предположения.

Эпилепсия – тяжелое неврологическое заболевание, которое широко распространено в современном обществе. Причины этого заболевания

могут быть различными, однако они приводят к нарушению баланса возбуждающих и тормозных процессов в головном мозге, а основными факторами, вызывающими судорожные припадки, являются ГАМК и глутамат [19, 20], в связи с чем фармакологические подходы, направленные на борьбу с эпилепсией, были связаны с воздействием именно на эти нейротрансмиттерные системы [21]. При эпилепсии в мозге наблюдается нарушения работы и других нейротрансмиттерных систем, в частности, дофаминергической [22]. Однако в литературе высказывается мнение о вовлечении и пептидергических систем мозга в патогенез эпилепсии [23–25], которые, возможно, также могут рассматриваться как потенциальные фармакологические мишени для коррекции этого заболевания.

Крысы линии Крушинского–Молодкиной (КМ) являются модельным объектом для изучения височной эпилепсии. Они характеризуются генетической предрасположенностью к судорожной активности, которая развивается на звуковые воздействия в возрасте 3-х месяцев [26] и проявляется в виде одно- или двухфазных генерализованных клонико-тонических судорожных припадков продолжительностью 1.5–2.5 мин [27, 28]. У крыс КМ выявлен повышенный уровень дофамина в мозге [29, 30], а также показано, что дофаминергические нейроны среднего мозга, контролирующие двигательную активность, вовлечены в развертывание судорог [31]. Гиппокамп является структурой мозга, которая вовлечена в патогенез судорожной активности при различных формах височной эпилепсии. После эпилептических припадков в гиппокампе происходят деструктивные изменения, что приводит к когнитивным нарушениям (в частности, к нарушению памяти), которые являются сопутствующей патологией при эпилепсии [32]. У крыс КМ показано, что повторяющиеся судорожные припадки приводят к гибели нейронов гиппокампа [33]. У крыс КМ также описаны изменения поведенческих реакций, в частности снижение локомоторной и исследовательской активности, повышенный уровень тревожности [34], а также отмечается аутичные особенности поведения на зоосоциальное взаимодействие [35].

Приведенные данные позволяют предположить изменения в меланокортиновой системе мозга у крыс КМ и вовлеченность этой системы в развитие судорожной активности. Целью настоящего исследования было оценить ключевые составляющие меланокортиновой системы (POMC, AgRP, MC3R и MC4R) в гипоталамусе и гиппокампе на фоне развития судорожной активности у крыс КМ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании были использованы 4-х месячные крысы (200–220 г) дочерней аутбредной

популяции линии КМ, из популяции, которая поддерживается в виварии ИЭФБ РАН [28]. Ранее характеристики эпилептической активности этих животных были подробно описаны [30]. У крыс КМ в 3-х месячном возрасте были подтверждены двухфазные генерализованные клонико-тонические судорожные припадки в ответ на звуковое воздействие (синусоидальный тон частотой 8 кГц, интенсивность 90 дБ).

Анализ судорожной активности. Предварительно крыс КМ проверяли на способность реагировать судорожными реакциями на звуковой стимул (синусоидальный тон частотой 8 кГц, интенсивность 90 дБ). Проводили видеозапись судорог и регистрацию актограммы животного. По достижении максимальной стадии судорожного припадка (обычно в пределах 2 минут) звук отключали. Интенсивность судорожных реакций оценивали в баллах в соответствии со шкалой, описанной ранее [36]: 0 – отсутствие реакции, 1 – двигательное возбуждение без судорожного припадка (пробежка или дикий бег), 2 – начальное двигательное возбуждение, сменяемое тормозной паузой и далее второй волной двигательной активности с выраженными клоническими судорогами без падения животного на бок, 3 – генерализованная стадия, отличающаяся по интенсивности от вышеописанной тем, что вторая волна двигательной активности, завершается падением животного на бок и клонико-тоническими судорогами с экстензией конечностей и хвоста, 4 – начальное двигательное возбуждение сразу же без тормозной паузы переходит в генерализованные клонико-тонические судороги. Для дальнейших исследований отбирали высоко-возбудимых крыс, реагировавших на звук генерализованными клонико-тоническими судорожными припадками интенсивностью 3 или 4 балла. Контролем для крыс КМ в нашем эксперименте были взяты нечувствительные к действию указанной звуковой стимуляции 4-х месячные самцы крыс Wistar. Отобранных животных содержали в индивидуальных клетках в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде и использовали в экспериментах через 2 дня после тестирования.

Приготовление проб. Эксперименты проводили в утренние часы. После внутрибрюшинного наркоза хлорал гидратом (400 мг/кг) крыс декапитировали, мозг извлекали из черепа и немедленно замораживали в сухом льду или фиксировали погружением в 4%-ный забуференный раствор параформальдегида (pH 7.4) для иммуногистохимических исследований. Из замороженного мозга (при -15°C) вырезали область гипоталамуса (для молекулярных исследований) и область дорзального гиппокампа (для анализа уровня белка) согласно атласу мозга крысы [38].

Анализ экспрессии генов. Ткань гипоталамуса погружали в TRI-reagent (Invitrogen, США), согласно

инструкции производителя, выделяли тотальную РНК, которую использовали для приготовления обратной транскрипции (ОТ) и анализа уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени, протокол ранее был подробно описан [30, 38]. Для реакций использовали прямой (F – forward) и обратный (R – reverse) праймеры, синтезированные фирмой Евrogen (Evrogen, Россия), характеристики которых представлены в табл. 1. Амплификацию проводили в растворе (общий объем 25 мкл), который содержал 10 нг ОТ-продукта, по 0.4 мкМ F- и R-праймеров и реакционную смесь qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Реакции проводили в 96-луночных планшетах (в триплетах) с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) согласно стандартному протоколу (Applied BioSystems, США). Результаты анализировали с помощью метода $\Delta\Delta C_t$ и программ 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения относительного количества мРНК в группе “КМ” ($n = 10$) нормировали по их значениям в группе “Wistar” ($n = 8-9$), данные представлены в условных единицах (у. е.).

Вестерн-блоттинг. Из области дорзального гиппокампа крыс КМ ($n = 6$) и Вистар ($n = 6$) были приготовлены пробы для определения уровня белков методом Вестерн-блоттинг согласно методике, подробно описанной ранее [39]. Мембраны инкубировали в течение ночи (при 4° С) в первичных антителах: кролика к MC3R (Sigma; Mr = 36 кДа) в разведении 1:500. Антитела разводили в блокирующем растворе (5% обезжиренное сухое молоко, разведенное на TRIS-буфере с 0.1% Tween-20, pH 7.4). Также для инкубации использовали

вторичные IgG козы против кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma; 1:10000). Уровень контрольного белка в пробе определяли на тех же мембранах после стриппинга. Были использованы первичные антитела мыши к GAPDH (BioLegend; 1:2000; Mr = 37 кДа) и вторичные IgG козы против мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США, 1:20000). Для визуализации хемифлуоресцентного сигнала использовали реагент ECL-Prime и чувствительную фотопленку (Amersham, Великобритания).

Иммуногистохимический анализ. Для иммуногистохимических исследований из фиксированного и замороженного мозга крыс КМ ($n = 5$) и Wistar ($n = 5$) из области гипоталамуса и гиппокампа с помощью криостата (Leica CM-1510, Германия) были изготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов толщиной 20 мкм, которые использовали для иммуногистохимических реакций, протокол ранее описан [30]. Для иммуномечения использовали первичные антитела мыши к POMC (Abcam; 1 : 1000), кролика к AgRP(83–132) (PhoenixPeptide Inc.; 1 : 500), к MC3R (Sigma; 1 : 500), к MC4R (MyBioSource, 1 : 300). Также были использованы конъюгированные с биотином IgG козы против мыши и против кролика (Vector Labs. Inc.; 1 : 600) и комплекс стрептавидин-пероксидаза (Sigma; 1 : 1000). Визуализацию проводили с помощью 0.05%-го раствора диаминобензидина (Sigma) с 0.015% перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой и после стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло в прозрачную среду Bio-Mount (Bio-optica, Италия). Специфичность реакций проверяли с помощью реакций без первичных антител.

Таблица 1. Последовательность использованных в работе праймеров

Ген	Положение	Последовательность	NCBI номер
<i>Pomc</i>	F	AGGACCTCACCACGGAAAG	NM_013556.2
	R	GTCAAGGGCTGTTCATCTCC	
<i>Agrp</i>	F	TGAAGAAGACAGCAGCAGACC	NM_009377.2
	R	TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC	
<i>Mc3r</i>	F	CAGCACATGGATAATATCTTCGACTCT	NM_009209.3
	R	GGCAATGGCCAGGAGGTT	
<i>Mc4r</i>	F	TGGGTGTCATAAGCCTGTTGG	NM_008078.2
	R	GCGTCCGTGTCCGTA CTG	
* <i>Gapdh</i>	F	GTGTTTCCTACCCCAATGTATCC	NM_008077.4
	R	GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT	

* – ген *Gapdh* (glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase) был использован в качестве контрольного.

Изображения структур получали в проходящем свете с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1 (Германия) со встроенной видеокамерой AxioCam 712, программного обеспечения для захвата изображений Zen 3.4. (blue edition). У каждого животного для каждой иммуногистохимической реакции было сделано 5–6 снимков. С помощью программы Image J на каждом снимке оценивали оптическую плотность POMC, MC3R или MC4R в 10–12 нейронах ARC или гиппокампа, уровень AgRP оценивали в иммунопозитивных отростках на стандартной площади ARC. Данные представлены в у. е.

Введение крысам KM неселективного блокатора MC3/4R (SHU 9119, Швейцария). Непосредственно перед началом исследований проводили фоновый тест на действие звука. Крысам внутримышечно вводили 0.5 мл воды для инъекций и через 30 мин вызывали аудиогенный судорожный припадок, измеряя латентный период и интенсивность реакции. Эти параметры припадка принимали в качестве контрольных. Блокатор растворяли в PBS (pH 7.4) и вводили внутримышечно (0.5 мл) в дозе 30 мкг/кг ($n = 9$) или 40 мкг/кг ($n = 18$) спустя 2 дня после фонового тестирования. Через определённый интервал времени (30 мин, 1, 2, 3, 4 и 24 ч) после введения предъявляли звуковой сигнал. Оценивали изменения параметров аудиогенных судорожных реакций на звук по сравнению с контрольными.

Статистический анализ проведен с помощью пакета программ GraphPad Prism 10.2 и IBM SPSS Statistica 23.0. Проверку на нормальности осуществляли с помощью теста Шапиро–Уилка. Анализ результатов ПЦР проведен с помощью парного t -критерия для независимых выборок. Результаты Вестерн-блоттинга и иммуногистохимического исследования оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Для сравнения частот судорог в разные временные периоды после введения препарата применяли Q -критерий Кохрена. Изменения интенсивности припадка анализировали с помощью критерия χ^2 Фридмана для повторных планов (с апостериорными сравнениями с помощью T -критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони). Латентные периоды развития судорог (у животных, которые их имели) сравнивали с помощью непараметрического критерия Краскала–Уоллиса (применение повторных планов в данном случае было невозможно, так как число крыс, у которых судороги были выявлены, варьировало в различные временные периоды). Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$. Данные представлены как среднее и стандартные ошибки, либо как медианы с интерквартильными размахами, n — количество животных в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты ПЦР в реальном времени демонстрируют (рис. 1), что в гипоталамусе крыс KM по сравнению с крысами Wistar отсутствуют отличия между уровнем экспрессии *Pomc* ($t = 0.45$; $p = 0.63$). При этом у крыс KM выявлено увеличение уровня мРНК AgRP (в 4 раза, $t = 4.69$, $p < 0.05$), мРНК MC3R (в 1.7 раз, $t = 1.79$, $p = 0.07$) и MC4R (в 2.4 раза, $t = 4.03$, $p < 0.05$) по сравнению с соответствующим показателем у крысы Wistar (рис. 1).

Анализ иммуногистохимических реакций на препаратах мозга не выявил достоверных отличий оптической плотности POMC в нейронах ARC между крысами Wistar $M = 0.46$ (0.43; 0.50) и KM ($M = 0.48$ (0.39; 0.49), $U = 11.5$, $p = 0.8$), количественный анализ представлен на рис. 2. Оптическая плотность AgRP в области ARC у крыс Wistar была меньше, чем у крыс KM ($M = 0.08$ (0.06; 0.10) и $M = 0.18$ (0.16; 0.18), $U = 0$, $p < 0.05$; рис. 2, 3). Визуально более интенсивный уровень AgRP у крыс KM отмечали в иммунопозитивных отростках и в других структурах гипоталамуса, в частности в паравентрикулярном ядре.

В нейронах ARC оптическая плотность MC3R у крыс Wistar была меньше, чем у KM (соответственно $M = 0.43$ (0.36; 0.48) и $M = 0.55$ (0.54; 0.63), $U = 0$, $p < 0.05$; рис. 2, 4). Оптическая плотность MC4R в ARC у крыс Wistar также была меньше, чем у KM (соответственно $M = 0.19$ (0.16; 0.21) и $M = 0.28$ (0.24; 0.30), $U = 0$, $p < 0.05$; рис. 2). Визуально более интенсивная иммуногистохимическая реакция к MC3R и MC4R наблюдалась в нейронах других структур гипоталамуса, в частности в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах.

Таким образом, представленные данные демонстрируют, что в гипоталамусе у крыс KM по сравнению с крысами Wistar при отсутствии изменения

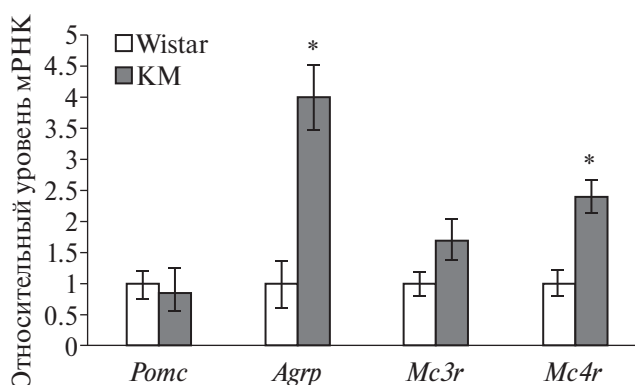


Рис. 1. Анализ экспрессии генов, кодирующих POMC, AgRP, MC3R и MC4R в гипоталамусе крысы Wistar ($n = 8-9$) и KM ($n = 10$), данные представлены в условных единицах. Обозначения: * — статистически достоверные отличия от группы Wistar ($p < 0.05$), t -критерий Стьюдента.

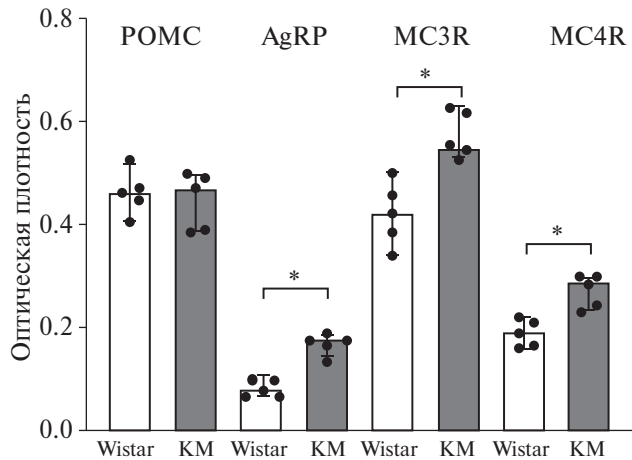


Рис. 2. Анализ уровня POMC, AgRP, MC3R и MC4R в аркуатном ядре гипоталамуса крысы Wistar ($n = 5$) и KM ($n = 5$). * – достоверность отличий группы KM от соответствующей группы Wistar ($p < 0.05$) (U-критерий Манна-Уитни). Результаты представлены как медиана с интерквартильными размахами в условных единицах.

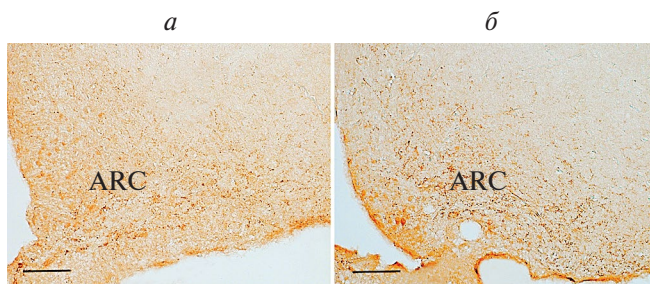


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция к AgRP в аркуатном ядре (ARC) гипоталамуса крысы Wistar (a) и KM (b). Масштаб 100 мкм.

экспрессии гена *Pomc* и, соответственно, уровня кодируемого им белка, отмечено увеличение уровня экспрессии генов и белков меланокортиновых рецепторов.

В гиппокампе анализ уровня белка, проведенный с помощью Вестерн-блоттинга, демонстрирует более высокий уровень MC3R у крыс KM ($M = 0.90$ (0.78; 0.97) по сравнению с крысами Wistar ($M = 0.73$ (0.63; 0.81) $U = 4.5$, $p < 0.05$, рис. 5. При использовании антител к MC4R методом Вестерн блоттинг получилась слабая реакция, поэтому оценили уровень этого белка в гиппокампе с помощью иммуногистохимического метода. Полученные результаты демонстрируют более высокий уровень оптической плотности MC4R у крыс KM по сравнению с крысами Wistar в поле CA1 (соответственно $M = 0.16$ (0.14; 0.20) и $M = 0.11$ (0.09; 0.12), $U = 0$, $p < 0.05$) и в поле CA3 гиппокампа, где в телах нейронов

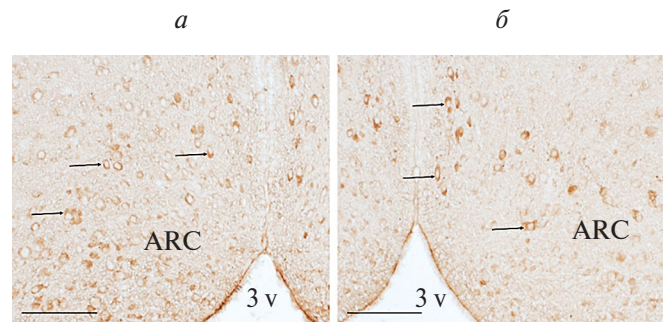


Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция к MC3R в аркуатном ядре (ARC) гипоталамуса крысы Вистар (a) и KM (b). Стрелки указывают на тела иммунопозитивных нейронов, 3 v – третий желудочек мозга. Масштаб 100 мкм.

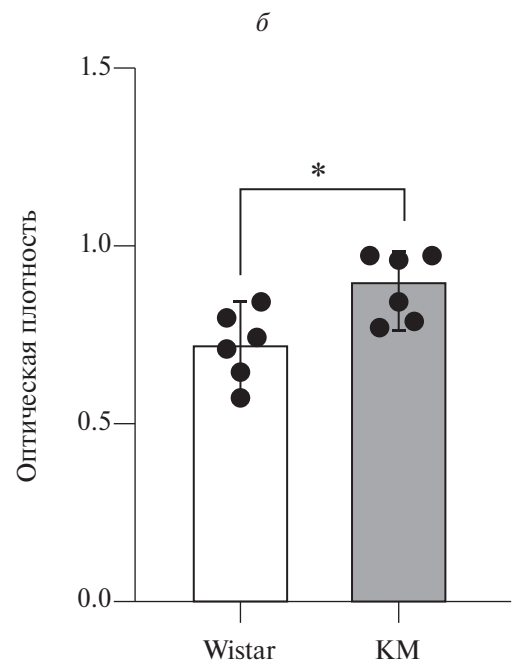


Рис. 5. Результаты Вестерн-блоттинга демонстрируют: a – уровень белка MC3R и контрольного белка GAPDH в дорзальном гиппокампе крысы Wistar ($n = 6$) и KM ($n = 6$), б – статистический анализ данных, которые представлены как медиана с интерквартильными размахами в условных единицах, * – достоверность отличий ($p < 0.05$), U-критерий Манна-Уитни.

наблюдается наиболее интенсивная реакция к MC4R ($M = 0.22$ (0.20; 0.24) и $M = 0.15$ (0.21; 0.23), $U = 0$, $p < 0.05$; рис. 6), а также и в отростках.

Таким образом полученные данные свидетельствуют о более высоком уровне белков MC3R и MC4R не только в структурах гипоталамуса, но и в гиппокампе — структуре мозга, которая у крыс KM вовлечена в патогенез эпилептической активности. Эти данные стали предпосылкой для исследования возможности влияния синтетического блокатора MC3R/MC4R на развитие судорожной активности.

Внутримышечное введение крысам KM SHU 9119. Через 30 мин после введения препарата в дозе 30 мкг/кг крысы реагировали на звуковое воздействие развитием полноценного судорожного припадка. После введения крысам препарата в дозе 40 мкг/кг тестирование аудиосигналом проводили

через различные временные промежутки после инъекции. Через 30 мин из 18 экспериментальных крыс припадок фиксировали у 13 животных (72%), через 1 ч — у 13 (72%), 2 ч — у 11 (67%), 3 ч — у 9 (50%), 4 ч — у 6 (33%), через 24 ч — у 10 (56%) крыс (рис. 7а), изменения частоты судорог достоверны ($Q = 21.4$; $p = 0.002$, рис. 7а).

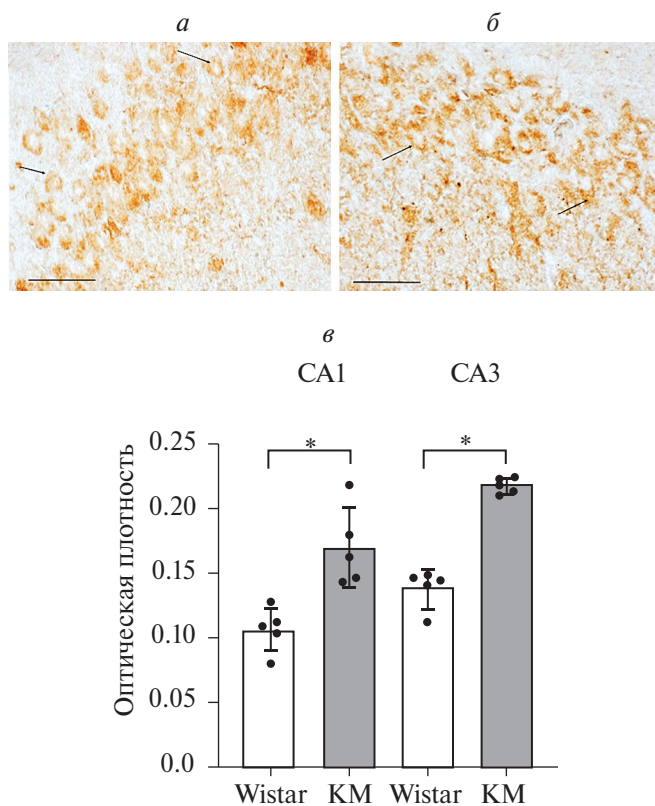


Рис. 6. Иммуногистохимическая реакция к MC4R в поле CA3 гиппокампа крысы Wistar (а), KM (б) и результат статистического анализа (в) оптической плотности MC4R в нейронах поля CA1 и CA3 гиппокампа. На микрофотографиях (а, б) стрелки указывают на перикарион иммунопозитивных нейронов, масштаб 100 мкм. На графике (в) данные представлены как медиана (М) с интерквартильными размахами в условных единицах, * — достоверность отличия ($p < 0.05$), между соответствующими группами, $n = 5$ в каждой группе, U-критерий Манна-Уитни. Рис.

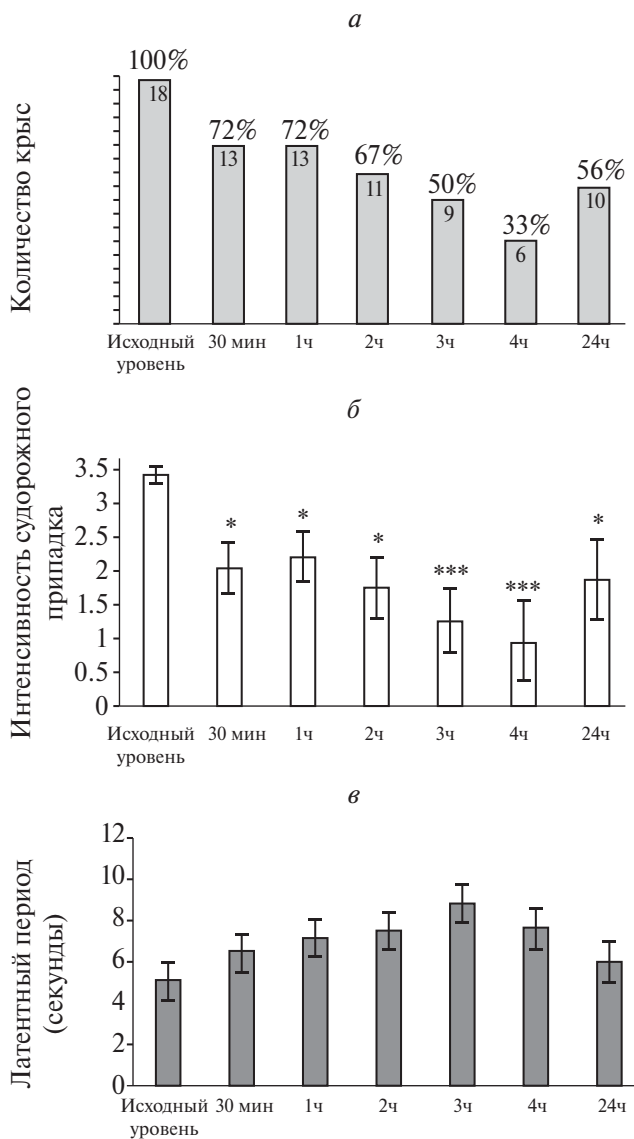


Рис. 7. Результаты введения крысам KM SHU9119 — неселективного блокатора MC3R/MC4R. а — количество крыс в каждой группе (цифры на столбце), у которых выявлены судороги после введения препарата (в % относительно исходного уровня 100%); б — изменение интенсивности судорожного припадка (в баллах) у этих крыс, достоверность отличия от исходного уровня (Т-критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони): * — $p < 0.05$, *** — $p < 0.0001$; в — изменение латентного периода (в секундах) у этих крыс.

В контрольном уровне интенсивность припадка составляла 3.4 ± 0.3 балла, после введения препарата она снижалась: через 30 мин до 2.3 ± 0.3 баллов, 1 ч — до 2.7 ± 0.3 баллов, 2 ч — до 2.7 ± 0.3 , 3 ч — до 2.6 ± 0.3 , 4 ч — до 2.8 ± 0.5 баллов, а через 24 ч составляла 3.4 ± 0.3 балла. Результаты статистического анализа свидетельствуют о том, что значение изменения интенсивности судорог достоверны (критерий Фридмана $\chi^2_{\text{г}} = 36.4$; $p < 0.05$). Апостериорные сравнения, проведенные с помощью Т-критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони, выявили достоверное снижение интенсивности судорог на всех исследованных сроках после введения препарата (рис. 7б).

У животных, у которых после введения препарата судорожный припадок развивался, отмечено увеличение его латентного периода по сравнению с контрольным уровнем, однако из-за небольшого количества крыс, у которых выявлены судороги, различия недостоверны ($H = 3.5$; $p = 0.6$; рис. 7в).

Таким образом, полученные данные демонстрируют дозозависимый противосудорожный эффект SHU 9119, максимальное проявление которого наблюдалось через 3 и 4 ч после введения препарата.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные демонстрируют, что в гипоталамусе крыс КМ при отсутствии по сравнению с крысами Вистар изменений уровня экспрессии гена *Pomc* и кодируемого им белка, происходит увеличение экспрессии генов и уровня белков меланокортиновых рецепторов в нейронах. Полученные данные могут свидетельствовать о повышении чувствительность клеток-мишеней к продуктам POMC, в частности альфа-MSH — основному агонисту меланокортиновых рецепторов в мозге млекопитающих [2]. Следует отметить, что MC3R экспрессируются и в самих POMC-продуцирующих нейронах ARC, что позволяет их рассматривать как ауторецепторы [6].

В гипоталамусе крыс КМ наблюдается увеличение экспрессии гена *AgRP* и уровня его белка — эндогенного антагониста MC3R/MC4R в мозге, что, по-видимому, можно рассматривать как обратную реакцию на увеличение уровня MC3/MC4R. Таким образом, у крыс КМ в меланокортиновой системе отмечается дисбаланс между уровнем предшественника агониста и эндогенного антагониста MC3/MC4R, что, очевидно, отражается и на функционировании клеток-мишеней из-за нарушения в них меланокортиновой передачи. Мы провели анализ экспрессии *Pomc* и его белка в гипоталамусе. Однако наши собственные наблюдения, как и данные других авторов, свидетельствуют об экспрессии POMC в различных структурах мозга, в том числе и в гиппокампе [3–5], уровень которой мы не оценивали.

Ранее в экспериментах *in vivo* и *in vitro* выявлен тормозный эффект AgRP на дофаминергические нейроны мозга [14, 40]. Однако у крыс КМ на фоне высокого уровня AgRP отмечено не уменьшение, а повышение уровня дофамина в мозге [29, 30], что может быть следствием нарушения интегративных взаимодействий между меланокортиновой и другими системами мозга, в частности орексинергической [30], вовлеченными в контроль дофаминергической системы. Известно, что в нейронах ARC AgRP колокализован с ГАМК [41, 42] и участвует в регуляции его выведения через пресинаптическое торможение, что, очевидно, приводит к уменьшению выведения ГАМК. При этом MC3/MC4R экспрессируются как в дофамин-, так и в ГАМК-нейронах [43], что свидетельствует об участии MC3/MC4R в регуляции баланса дофамин-ГАМК, который, очевидно, крыс КМ нарушен. Однако не понятно, изменяется ли у крыс КМ выведение самого AgRP на фоне его повышенной экспрессии, так как использование его аналога SHU 9119 — химического блокатора MC3/MC4R приводило к уменьшению судорожной активности у крыс КМ, что, по-видимому, свидетельствует о недостатке эндогенного антагониста.

Блокатор SHU 9119 использовался при изучении пищевого поведения как при внутрижелудочковом способе введения, так и при внутрибрюшинном и внутримышечном. Показано, что он связывается только с трансмембранным доменом MC3R/MC4R, в отличие от AgRP, который взаимодействует и с внеклеточным доменом этого рецептора, действуя как обратный агонист [10, 44, 45]. Эффект SHU 9119 зависел от дозы препарата и максимально проявлялся через 3–4 часа после его введения, что согласуется с периодом проявления максимального эффекта AgRP [14, 40].

Полученные данные демонстрируют изменения компонентов меланокортиновой системы в мозге крыс при генетически обусловленной височной эпилепсии, а химическая блокада меланокортиновых рецепторов приводит к уменьшению судорожной активности, что подтверждает вовлеченность этой системы в патогенез данной формы эпилепсии. Полученные данные согласуются с результатами, демонстрирующими противосудорожный эффект АСТН [24] — продукта POMC, который также может быть агонистом меланокортиновых рецепторов. Однако осталось невыясненным, чем отличались крысы КМ, у которых при предъявлении звука после введения препарата судороги не возникали, от тех крыс КМ, у которых судороги все же развивались. У последних, однако, отмечено статистически значимое снижение интенсивности судорожного припадка и тенденции к увеличению латентного периода наступления судорог. Возможно, что у этих крыс более высокая доза препарата могла бы быть эффективной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшая функция меланокортиновой системы гипоталамуса — контроль энергетического баланса организма. Однако получено много фактов, демонстрирующих ее более широкое модуляторное влияние на другие “непищевые” функции мозга, вовлеченность в контроль нейронных путей, которые их регулируют как в процессе развития организма, так и во взрослом возрасте [16]. Это, очевидно, определяет психические нарушения как сопутствующую патологию при метаболических расстройствах. Эпилептическая активность приводит к гибели нейронов мозга [46], что также можно рассматривать как следствие нарушения их энергетического баланса при нарушениях в меланокортиновой передаче, что свидетельствует в пользу предположения об энергетической природе нейродегенеративных процессов [47].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все экспериментальные процедуры соответствовали положениям Animal Welfare act (2006) и European Communities Council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС), а также правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.” Дизайн исследования одобрен Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Протокол 5/2019 от 23.05.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gantz I., Fong T.M. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. V. 284. P. 468–474.
- Cone R.D. // Nat. Neurosci. 2005. V. 8. № 5. P. 571–578.
- Chen J., Yang W. // Med. Sci. Sports Exerc. 2000. V. 32. № 5. P. 954–957.
- Shen Y., Tian M., Zheng Y., Gong F., Fu A.K.Y., Ip N.Y. // Cell Rep. 2016. V. 17. P. 1819–1831.
- Romanova I.V., Mikhailova E.V., Mikhrina A.L., Shpakov A.O. // Anat. Rec. (Hoboken). 2023. V. 306. № 9. P. 2388–2399.
- Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J. // J Neurosci. 1999. V. 19. P. 1–7.
- Marks D.L., Cone R.D. // Recent Prog. Horm. Res. 2001. V. 56. P. 359–375.
- Schwartz M.W., Morton G.J. // Nature. 2002. V. 418. P. 595–597.
- Stutz A.M., Staszkievicz J., Ptitsyn A., Argyropoulos G. // Obesity. 2007. V. 15. № 3. P. 607–615.
- Sutton G.M., Josephine Babin M., Gu X., Hruby V.J., Butler A.A. // Peptides. 2008. V. 29. № 1. P. 104–111.
- Xia G., Han Y., Meng F., He Y., Srisai D., Farias M., Dang M., Palmiter R.D., Xu Y., Wu Q. // Mol. Psychiatry. 2021. V. 26. № 7. P. 2837–2853.
- Dietrich M.O., Bober J., Ferreira J.G., Tellez L.A., Mineur Y.S., Souza D.O., Gao X.B., Picciotto M.R., Araújo I., Liu Z.W., Horvath T.L. // Nat. Neurosci. 2012. V. 15. № 8. P. 1108–1110.
- Lippert R.N., Ellacott K.L.J., Cone R.D. // Endocrinol. 2014. V. 155. № 5. P. 1718–1727.
- Mikhrina A.L., Romanova I.V. // Neurosci. Behav. Physiol. 2015. V. 45. № 5. P. 536–541.
- Roseberry A.G., Stuhrman K., Dunigana A.I. // Neurosci. Biobehav. Reviews. 2015. V. 56. P. 15–25.
- Stutz B., Waterson M.J., Šestan-Peša M., Dietrich M.O., Škarica M., Sestan N., Racz B., Magyar A., Sotonyi P., Liu Z.W., Gao X.B., Matyas F., Stojiljkovic M., Horvath T.L. // Mol. Psychiatry. 2022. V. 27. № 10. P. 3951–3960.
- Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. // Pharmacol. Rev. 2011. V. 63. P. 182–217.
- Baik J.H. // Front. Neural. Circuits. 2013. V. 7. P. 152.
- Weaver D.F., Pohlmann-Eden B. // Epilepsia. 2013. V. 54 (S.2). P. 80–85.
- Zaitsev A.V., Khazipov R. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. 12415.
- Akyuz E., Polat A.K., Eroglu E., Kullu I. // Life Sci. 2021. V. 265. 118826.
- Juliá-Palacios N., Molina-Angueta C., Sigatulina Bondarenko M., Cortès-Saladelafont E., Aparicio J., Cuadras D., Horvath G., Fons C., Artuch R., García-Cazorla A. // Dev. Med. Child. Neurol. 2022. V. 64. № 7. P. 915–923.
- Dobolyi A., Kékesi K.A., Juhász G., Székely A.D., Lovas G., Kovács Z. // Curr. Med. Chem. 2014. V. 21. № 6. P. 764–87.
- Clynen E., Swijsen A., Raijmakers M., Hoogland G., Rigo J.M. // Mol. Neurobiol. 2014. V. 50. № 2. P. 626–46.
- Janković S.M., Dešević M. // Expert. Rev. Neurother. 2022. V. 22. № 2. P. 129–143.
- Семюхина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И. // Журн. высш. Нерв. деят-ти. 2006. Т. 56 (3). С. 298–316. [Semiokhina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva I.I. // Zh. Vyssh. Nerv. Deyat-ti. V. 56. № 3. P. 298–316. (In Russ.)]

27. *Poletaeva I.I., Surina N.M., Kostina Z.A., Perepelkina O.V., Fedotova I.B.* // *Epilepsy Behav.* 2017. V. 71 (Pt B). P. 130–141.
28. *Ватаев С.И.* // *Росс. Физиол. журн. им ИМ Сеченова.* 2019. Т. 105. № 6. С. 667–679. [*Vataev S.I.* // *Russ. J. Physiol.* 2019. V. 105. № 6. P. 667–679. (In Russ.)]
29. *Сорокин А.Я., Кудрин В.С., Клодт П.М., Туомисто Л., Полетаева И.И., Раевский К.С.* // *Генетика.* 2004. Т. 40. № 6. С. 846–849.
30. *Morina I.Y., Mikhrina A.L., Mikhailova E.V., Vataev S.I., Hismatullina Z.R., Romanova I.V.* // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022. V. 58. P. 1961–1972.
31. *Faingold C.L.* // *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* / Ed. Noebels J.L. et al.: Natl Center Biotechnol Informat (US). 4th edition. 2012.
32. *Helmstaedter C., Witt J.A.* // *Seizure.* 2017. V. 49. P. 83–9.
33. *Kulikov A.A., Naumova A.A., Dorofeeva N.A., Ivlev A.P., Glazova M.V., Chernigovskaya E.V.* // *Epilepsy Behav.* 2022. V. 134. 108846.
34. *Surina N.M., Poletaeva I.I., Fedotova I.B., Kalinina T.S., Volkova A.V., Malikova L.A., Rayevsky K.S.* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Т. 151. № 1. С. 47–50.
35. *Rebik A.A., Riga V.D., Smirnov K.S., Sysoeva O.V., Midzyanovskaya I.S.* // *J Pers. Med.* 2022. V. 12. № 12. 2062.
36. *Ватаев С.И., Жабко Е.П., Лукомская Н.Я., Оганесян Г.А., Магазаник Л.Г.* // *Рос. физиол. ж. им. И.М. Сеченова.* 2009. Т. 95. № 8. С. 802–812. [*Vataev S.I., Zhabko E.P., Lukomskaya N.Y., Oganessian G.A., Magazanik L.G.* *Russ. J. Physiol.* 95(8): 802–812. 2009. (In Russ).]
37. *Paxinos G.T., Watson Ch.* // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* / Fourth Edition. Academic Press, San Diego, California, USA, 1998. Int. Standard Book Number: 0-12-547617-5.
38. *Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O.* // *Neurochem. Res.* 2018. V. 43. № 4. P. 821–837.
39. *Zaitsev A.V., Malkin S.L., Postnikova T.Y., Smolensky I.V., Zubareva O.E., Romanova I.V., Zakharova M.V., Karyakin V.B., Zavyalov V.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 23. 5852.
40. *Mikhrina A.L., Saveleva L.O., Alekseeva O.S., Romanova I.V.* // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2020. V. 50. № 3. P. 367–373.
41. *Tong Q., Ye Ch-P., Jones J.E., Elmquist J.K., Lowell B.B.* // *Nat. Neurosci.* 2008. V. 11. № 9. P. 998–1000.
42. *Douglass A.M., Resch J.M., Madara J.C., Kucukdereli H., Yizhar O., Grama A., Yamagata M., Yang Z., Lowell B.B.* // *Nature.* 2023. V. 620. № 7972. P. 154–162.
43. *Мухрина А.Л., Чернышев М.В., Михайлова Е.В., Савельева Л.О., Романова И.В.* // *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2018. Т. 104. № 7. С. 769–779.
44. *Chai B.X., Neubig R.R., Millhauser G.L., Thompson D.A., Jackson P.J., Barsh G.S., Dickinson C.J., Li J.Y., Lai Y.M., Gantz I.* // *Peptides.* 2003. V. 24. P. 603–609.
45. *Chen M., Celik A., Georgeson K.E., Harmon C.M., Yang Y.* // *Regul. Peptides.* 2006. V. 136. P. 40–49.
46. *Rho J.M., Boison D.* // *Nat. Rev. Neurol.* 2022. V. 18. № 6. P. 333–347.
47. *Blass J.P.* // *J. Neurosci. Res.* 2001. V. 66. № 5. P. 851–856.

Analysis of the Melanocortin Brain System of a Krushinsky–Molodkina Rats with Genetic Predisposition to Audiogenic Seizures

I. V. Romanova¹, A. L. Mikhrina², and S. I. Vataev¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

²*The Hebrew University Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel*

The study was conducted on 4-month-old male rats of the Krushinsky–Molodkina (KM) line, genetically predisposed to audiogenic seizures, and Wistar rats, which are not sensitive to the effects of sound. In KM rats real-time PCR revealed an increase in the level of AgRP mRNA (4-fold, $p < 0.05$) and melanocortin receptors MC4R (2.4-fold, $p < 0.05$) in the hypothalamus vs. Wistar rats. No differences in the level of proopiomelanocortin mRNA were detected. The results of immunohistochemical analysis indicate an increased ($p < 0.05$) level of optical density of AgRP, MC3R and MC4R in the hypothalamic structures of KM rats vs. Wistar rats. In the dorsal hippocampus a statistically significant increase in the level of MC3R (by Western blotting) and MC4R (by immunohistochemistry) was also detected in KM rats vs. Wistar rats. The obtained results are discussed in connection with the revealed blocking dose-dependent effect of SHU9119, a non-selective MC3R/MC4R inhibitor, on seizure activity in KM rats.

Keywords: hypothalamus, epilepsy, proopiomelanocortin, melanocortin receptors, SHU9119

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК: 577.25

ДОЛГОСРОЧНАЯ ПАМЯТЬ: РОЛЬ СВЕТА И ОБУЧЕНИЯ В ПРЕОДОЛЕНИИ СТРЕССА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Е. В. Токмачева¹, А. В. Медведева¹, Б. Ф. Щеголев¹, Е. А. Никитина^{1, 2, *},
Е. В. Савватеева-Попова¹

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

²Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: 21074@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2024 г.

После доработки 29.07.2024 г.

Принята к публикации 01.08.2024 г.

Формирование условной связи позволяет организму изменять свои реакции на различные факторы среды, сочетая и мобилизуя необходимые внутренние адаптивные процессы. Предполагается наличие общих механизмов, лежащих в основе формирования адаптивных процессов — стрессорной реакции и обучения. Для разработки способов неинвазивной коррекции патологий нервной системы на модельном объекте генетики — дрозофиле изучали взаимосвязь адаптивных механизмов формирования условной связи и развития стрессорной реакции на ослабление магнитного поля Земли в условиях свет : темнота. Выявлена роль обучения и освещения в преодолении стресса в связи с формированием долгосрочной памяти в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания. В рамках квантовой динамики электронных и ядерных спинов переходных состояний радикальных молекул рассматривается гипотеза об их участии в формировании долгосрочной памяти.

Ключевые слова: обучение, память, криптохромы, магнитное поле, освещение, механизм радикальных пар

DOI: 10.31857/S1027813324040115, **EDN:** EGFXLW

ВВЕДЕНИЕ

В 50-х годах XX века в Институте физиологии им. И.П. Павлова в “лаборатории по переделке безусловных рефлексов”, возглавляемой М.Е. Лобашевым, проводились исследования по тренировке и формированию основных свойств нервной системы — возбудимости и торможения, посредством которых контролируются все физиологические функции организма. Полагая, что “все свойства нервной деятельности могут тренироваться на базе любого безусловного рефлекса: пищевого, оборонительного и полового, если тренировку методом условного рефлекса производить на стадии специализации врожденных рефлексов...”, в лаборатории были проведены исследования по изменению врожденного стереотипного поведения [1]. Пищевое подкрепление экстремальных стимулов — высокой (летальной!) температуры воды при содержании гидры, воздействие сильным (трещотка — 92 дБ) и сверхсильным звуковым генератором (частота — 800–850 Гц, сила звука — 107 дБ), а также подкормка в темновую фазу суток дневных птиц (куриц) позволила организмам адаптироваться к несвойственной среде обитания.

Интересно, что воздействие на безусловные рефлексы (переделка) — охранительное торможение при сильном звуке (сон и почесывание вплоть до выпадения перьев и ран кожного покрова у куриц), сон при наступлении сумерек — вскрыло огромный потенциал организма. Двухфазный суточный ритм, преодоление стрессорного воздействия звуком трещотки являлось не просто формированием условного рефлекса, но изменяло на годы (!) возбудимость нервных процессов, при этом снижая истощение нервной системы. Изменения затрагивали во многом физиологические характеристики внутренних органов за счет “высокого тонуса коры”, а также наблюдались “глубокие изменения в функциональных свойствах нервных клеток головного мозга” [2]. Опыты показали, что безусловные рефлексы отражают глубинные взаимоотношения организма и окружающей среды обитания и служат тем “рычагом”, “поворот” которого способен изменить всю физиологию организма.

В работах М.Е. Лобашева было использовано воздействие, адекватно которому формируются основные безусловные реакции — суточный ритм. “Вода определила развитие водной фауны,

суша — наземной фауны и воздух — орнитофауны. Но общей для всех трех сфер мы должны признать четвертую — сферу времени суток” [2]. Суточному ритму подчиняются все экологически значимые воздействия — освещение, содержание кислорода, магнитное поле и температура. Циркадные (около 24 часов) часы регулируют ритмы на уровне физиологии организма, метаболизма и поведения посредством клеточно-автономных транскрипционных петель обратной связи [3, 4]. Таким образом, использование элементов циркадных ритмов в качестве инструмента влияния на безусловные когнитивные характеристики дает возможность приблизиться к механизмам, лежащим в основе взаимовлияний организма и среды, что не только позволит корректировать нейропатологию [5], но и использовать потенциал, заложенный самой природой.

Показано, что механизмы развития стрессорной реакции и актуализации когнитивных функций (памяти и обучения) взаимосвязаны [6]. Именно эта взаимосвязь, по-видимому, лежит в основе преодоления стресса при тренировке условно-рефлекторной деятельности. Для того чтобы приблизиться к возможным механизмам преодоления стресса, необходимо было воспроизвести опыты лаб. М.Е. Лобашева на хорошо изученной генетикой модели с использованием воздействия с известными биохимическими последствиями. В связи с этим в качестве модельного объекта была выбрана дрозофила.

Одним из каналов связи экологически значимых факторов среды (освещение, содержание кислорода, магнитное поле и температура) и непосредственно нервной системы являются криптохромы [7, 8]. Воздействие магнитного поля и освещения осуществляется через фотоактивацию радикальных пар криптохромов [9]. Поэтому для создания модели в качестве стрессора применяли ослабленное магнитное поле (ОСМП) Земли при разных световых режимах. Тренировку нервных процессов осуществляли посредством условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) на основании полового безусловного рефлекса. В предыдущих исследованиях было показано, что 12-часовое пребывание в ОСМП Земли достоверно снижает показатели среднесрочной памяти в парадигме УРПУ [10].

Задача настоящего исследования состояла в том, чтобы выявить роль обучения в преодолении последствий ОСМП Земли в режимах свет : темнота при формировании долгосрочной памяти и на основе полученных данных приблизиться к пониманию возможных механизмов этого явления в целях применения в качестве неинвазивных методов лечения нейропатологии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования. Материалом исследования служила линия дикого типа *Drosophila melanogaster Canton-S (CS)* из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем” (Санкт-Петербург). Развитие проходило при температуре $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ со свето-темновым режимом 12:12 ч.

Экранирование магнитного поля Земли. Для экранирования магнитного поля (МП) Земли была изготовлена цилиндрическая камера, покрытая экранирующим материалом из аморфного магнетомягкого сплава АМАГ172. Величина индукции статического МП Земли в Колтушах составляет 50 мкТл. Коэффициент экранирования по постоянной составляющей магнитного поля равен 35 (величина индукции МП внутри камеры составляет 1.4 мкТл, снаружи 50 мкТл). Особенности физического моделирования ослабленного статического МП Земли описаны ранее [15].

Для освещения была использована светодиодная лампа ULTRAFLASH UF - 732 CO2, источник LEB, световой поток 350 лм, цветовая температура 6500 К, излучающая широкий спектр, в котором присутствуют частоты синей (320–390 нм) и зелёной (390–500 нм) областей, что совпадает с пиками спектра действия криптохрома (диапазон 350–400 нм с плато 430–450 нм) [4].

Схема эксперимента. Были проведены следующие варианты опыта:

1. Индивидуально отобранных наивных самцов помещали в камеру с ОСМП Земли на 12 часов на ночь, затем их извлекали из камеры, подсаживали самок и оставляли для тренировки в течение 5 часов. Регистрировали ИО непосредственно сразу после тренировки (точка 0) и через двое суток.

2. Наивных самцов вместе с самками помещали в ОСМП Земли в дневное время с закрытой крышкой камеры (в камере темно) и тренировали в течение 5 часов. Затем вынимали из камеры и регистрировали ИО непосредственно после тренировки и через двое суток.

3. Наивных самцов вместе с самками помещали в ОСМП Земли на 5 часов в дневное время с открытой крышкой камеры (в камере светло). ИО регистрировали сразу после тренировки и через двое суток.

4. Наивных самцов помещали в ОСМП Земли на 5 часов с открытой крышкой камеры. Затем их вынимали из камеры, тренировали в течение 5 часов с оплодотворенными самками и регистрировали ИО по вышеописанной схеме.

Регистрация долгосрочной памяти в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания. При анализе когнитивного поведения дрозофилы

использовали метод условно-рефлекторного подкрепления ухаживания (УРПУ) [11, 12]. УРПУ является естественной формой обучения у дрозофилы. После ухаживания за нерцептивной оплодотворенной самкой (тренировки) в норме у самца снижается интенсивность ухаживания за всеми последующими самками. При нарушении обучения и формирования памяти самцы продолжают активно ухаживать. На этом основана оценка способности к обучению самцов *D. melanogaster*.

Отбирали самцов исследуемой линии и содержали их индивидуально. В качестве объектов ухаживания для самцов использовали оплодотворенных за сутки до опыта самок линии *CS* в возрасте 5 сут. Отбирали мух без эфирного наркоза. Для формирования долгосрочной памяти (тренировки) 5-суточного самца, не имеющего опыта полового поведения, помещали в стаканчик со средой вместе с оплодотворенной 5-суточной самкой *CS* и оставляли на 5 часов. Тестирование проводили в возрасте 5 сут в специальных экспериментальных камерах. Обучение тестировали сразу после тренировки, долгосрочную память — через двое суток после тренировки, используя новых оплодотворенных самок *CS* в возрасте 5 сут. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения (наивных) [13, 14].

Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время исполнения элементов, несвязанных с ухаживанием (активность (побежка), прининг, покой). Регистрацию начинали через 45 с после помещения мухи в камеру.

В каждой группе тестировали 20 мух: 1 группа — сразу после 5-часовой тренировки, 2 группа — через 2 суток. Для расшифровки и анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы, подробно описанные в работе Н.Г. Камышева с соавторами [11].

Для каждого самца вычисляли индекс ухаживания (ИУ), т.е. время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения. Для количественной оценки результатов обучения вычисляли индекс обучения (ИО) по следующей формуле:

$$\text{ИО} = [(\text{ИУ}_\text{н} - \text{ИУ}_\text{экс}) / \text{ИУ}_\text{н}] \times 100\% = (1 - \text{ИУ}_\text{экс} / \text{ИУ}_\text{н}) \times 100\%,$$

где $\text{ИУ}_\text{н}$ — средний индекс ухаживания для независимых выборок самцов, не имеющих опыта полового поведения, $\text{ИУ}_\text{экс}$ — средний индекс ухаживания для независимых выборок самцов, прошедших тренировку [11].

Полученные результаты представлены в виде диаграмм, на которых отражен рассчитанный по

формуле индекс обучения с указанием ошибок средних значений для независимых выборок самцов.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи рандомизационного анализа ($\alpha_R < 0.05$). Выбор метода обусловлен тем, что использование обычных параметрических и непараметрических методов в данном случае затруднено. Рандомизационный анализ имеет преимущества по сравнению как с параметрическими методами, т.к. не зависит от предположений о нормальности распределения исследуемой переменной и равенстве дисперсий сравниваемых выборок, так и с непараметрическими методами, которые основаны на сравнении рангов, т.к. использует точные числовые значения переменных. В случае УРПУ сравнение двух индексов обучения вовлекает не 2, а 4 выборки (вариант 1: наивные самцы и самцы после тренировки; вариант 2: наивные самцы и самцы после тренировки).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты исследования влияния ОСМП Земли (12 часов экспозиции) на когнитивные функции. Выбор продолжительности воздействия связан с тем, что основной массив данных о влиянии ОСМП Земли был получен в этих условиях [10]. В предыдущих исследованиях было показано, что ОСМП Земли вызывает нарушение формирования среднесрочной памяти (3 часа после 30-минутной тренировки), не влияя на способность к обучению. 12 часов в ОСМП Земли с последующей 5-часовой тренировкой не повлияли на способность к обучению линии *CS*. Отметим, что тренировка в целях формирования долгосрочной памяти происходила в условиях нормального магнитного поля, при этом через двое суток ИО оказался достоверно ниже по сравнению с уровнем, характерным для *CS*. Таким образом, эффект ОСМП Земли носит пролонгированный характер и вероятно не влияет на ранние стадии долговременной потенциации.

Ранние стадии длятся от нескольких секунд до нескольких часов и зависят, главным образом, от ковалентных модификаций уже существующих белков. Во время ранней потенциации глутамат высвобождается из пресинаптического нейрона и активирует ионотропные AMPA и NMDA рецепторы, что открывает возможность проникновения Ca^{2+} внутрь постсинаптического нейрона. В нормальных условиях Ca^{2+} активирует Ca^{2+} /CaM-зависимую протеинкиназу II (CaMKII), которая фосфорилирует субъединицу GluA1 AMPAR, что увеличивает одноканальную проводимость и активизирует трафик AMPAR. AMPAR диффундируют в синапсы из других областей мембраны, облегчая дальнейшую передачу импульса. Немедленные модификации цитоскелета и, соответственно,

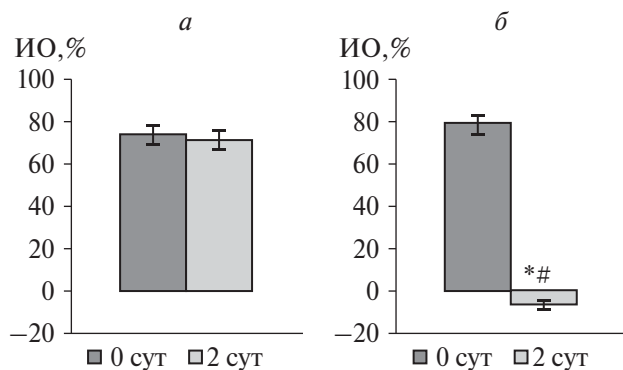


Рис. 1. Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании долгосрочной памяти у линии дикого типа *Canton S*. *а* – интактный контроль, *б* – воздействие ОСМП Земли (12 часов экспозиции). По оси абсцисс: время после завершения тренировки, сут; по оси ординат: ИО – индекс обучения, %. * – ИО достоверно отличается от интактного контроля; # – ИО в отсроченном тесте достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки (двусторонний тест рандомизации, $\alpha_R < 0.05$).

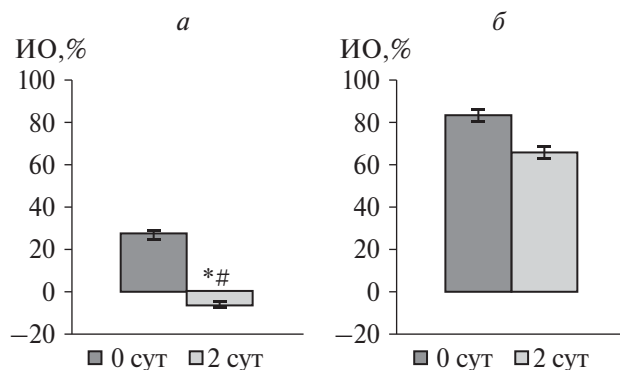


Рис. 2. Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания у линии дикого типа *Canton S* при тренировке в ОСМП Земли. *а* – тренировка в темноте, *б* – тренировка на свету. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, сут; по оси ординат: ИО – индекс обучения, %. * – ИО достоверно отличается от интактного контроля; # – ИО в отсроченном тесте достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки (двусторонний тест рандомизации, $\alpha_R < 0.05$).

шипиков дендритов, независимые от синтеза белка, также запускаются увеличением внутриклеточного Ca^{2+} (активация каскада тирозин и Src киназ – Rho и Ras GTPases – LIMK – динамика актина) [16]. Учитывая многочисленные литературные данные о влиянии ОСМП Земли на Ca^{2+} каналы, можно предположить, что внутриклеточное содержание Ca^{2+} в клетке недостаточно для развития событий долговременной потенциации в полной мере. В работах С.В. Сурмы с соавторами показано, что в ОСМП Земли снижается уровень высвобождения Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума [17]. Вместе с тем, эндоплазматический ретикулум взаимодействует с плазматической мембраной, тем самым играя важную роль в Ca^{2+} -опосредованной передаче внеклеточных сигналов внутрь клетки, включая ядро [18]. Возможной мишенью, согласно нашим данным [10, 19], является актиновый цитоскелет, что снижает эффективность синаптической трансдукции. Наши данные о нарушении формирования памяти в ОСМП согласуются с работами В. Zhang с соавторами о развитии амнезии в генерации дрозофил, выращенных в условиях гипомангнетного поля [20].

К наиболее интересным результатам привели опыты с тренировкой мух в ОСМП Земли (рис. 2). Оказалось, что если тренировать самцов на свету, то происходит формирование долгосрочной памяти и таким образом преодолевается стрессорное воздействие (рис. 2б). В темноте, по-видимому, блокируются процессы формирования долгосрочной памяти (рис. 2а). Эффект света не является пролонгированным, при обучении самцов в условиях нормального магнитного поля после 5-часового

пребывания в ОСМП Земли на свету процессы, связанные с долговременной потенциацией, не восстанавливаются (рис. 3). Только сочетание света и обучения дает положительный результат, что позволяет предположить однонаправленность этих процессов и их воздействие на мишень, функция которой нарушена или модифицирована в ОСМП Земли. Поговорка “ученье – свет” получает экспериментальное подтверждение.

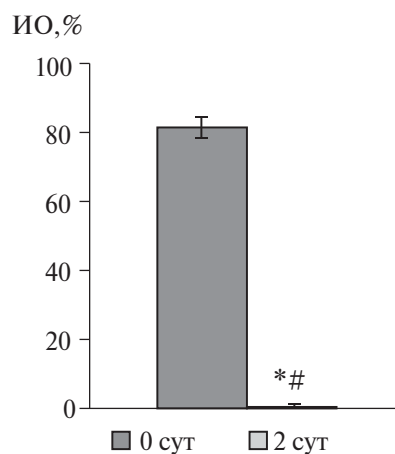


Рис. 3. Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания у линии дикого типа *Canton S* при воздействии ОСМП Земли (5 часов экспозиции на свету). По оси абсцисс: время после завершения тренировки, сут; по оси ординат: ИО – индекс обучения, %. * – ИО достоверно отличается от интактного контроля; # – ИО в отсроченном тесте достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки (двусторонний тест рандомизации, $\alpha_R < 0.05$).

Известно, что формирование долгосрочной памяти связано с синтезом белка. Высокий уровень Ca^{2+} ранних этапов потенциации активирует сигнальные каскады, опосредованные РКА, РКС и митоген-активируемыми протеинкиназами (МАРК), которые затем активируют факторы транскрипции. Наиболее изученный из них CREB представляет собой фактор транскрипции, который инициирует транскрипцию группы генов, содержащих CREB-зависимые элементы [16]. В темноте, в условиях ОСМП, уровень Ca^{2+} , по-видимому, недостаточен для запуска синтетических процессов консолидации памяти. Фактор света привносит необходимые изменения для долгосрочных изменений потенциации. Известно, что у рыбок данные активируемые светом криптохромы, которые не утрачивают светочувствительность (в том числе у дрозофилы), активируют нижестоящий РКС-зависимый сигнальный путь МАРК, что в свою очередь увеличивает фосфорилирование CREB [21]. У дрозофилы МАРК p38 является компонентом циркадной регуляции [22]. Согласно литературным данным, активность часовых нейронов l-LN_{vs} необходима для формирования памяти с участием CREB, и именно период консолидации памяти зависит от циркадных ритмов. Тренировка и консолидация в парадигме УРПУ в темноте не приводила к нарушениям формирования памяти, что согласуется и с нашими пилотными экспериментами. Напротив, если мух тренировали на свету, а потом помещали в темноту, то процессы консолидации нарушались [23, 24]. В нашем случае и тренировка, и консолидация производилась либо на свету, либо в темноте, поэтому нарушение долгосрочной памяти в варианте с тренировкой в темноте связана с повреждающим действием ОСМП Земли. Известно, что даже непродолжительная инкубация слепышей Анселла в гипоманнитном поле изменяет экспрессию белка c-Fos (белка, регулирующего развитие нейронов, универсального маркера нейрональной активности) в разных отделах мозга [25].

Вместе с тем интересно посмотреть на результаты эксперимента и с другой точки зрения. Мы знаем, что светочувствительным сенсором магнитного поля являются криптохромы, принцип действия которых связан с изменением спина радикальных пар. Незначительные изменения в спиновой динамике, индуцированные слабым магнитным полем (переход из синглетного состояния в триплетное), могут заметно повлиять на метаболические процессы, в нашем случае на синтез белка [26]. Показано, что динамика электронных пар криптохромов определяет и синхронизацию циркадных ритмов млекопитающих. В этом случае криптохромы локализуются в ретине глаз [27]. Можно предположить, что фотоиндукция радикальных пар в криптохроме изменяет спиновую динамику характерную для ОСМП Земли, что соответственно скажется на

синтетических процессах, сопутствующих долговременной потенциации. Из этого вытекает следствие, а именно — участие в формировании долгосрочной памяти процессов, описываемых квантовой динамикой электронных и ядерных спинов переходных радикальных молекул.

В настоящее время механизмом радикальных пар (МРП) в отношении различных явлений в мозге заинтересовались многие исследователи. МРП объясняет, как квантовые эффекты могут влиять на биохимическую и клеточную передачу сигналов. Модель радикальных пар может дать правдоподобное объяснение эффектам магнитного поля, наблюдаемым при активации NMDAR, влиянии гипоманнитного поля на нейрогенез и на реорганизацию микротрубочек [28]. Известно, что радикальные пары могут генерировать активные формы кислорода, которые связывают МРП с окислительно-восстановительными процессами, что объясняет влияние гипоксии на циркадные часы [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Удалось продемонстрировать роль обучения в нивелировании последствий стрессорного воздействия. Важно, что это произошло на основе условно-рефлекторной деятельности без использования фармакологических препаратов. Постановка опыта с использованием интимно связанных механизмов действия ОСМП Земли и света на живые организмы и заведомо известной мишенью действия стрессорного фактора позволило предположить, что условно-рефлекторная деятельность на свету воздействует на ту же мишень, что и ОСМП Земли, нивелируя его действие. В связи с этим было сформулировано предположение о роли МРП как в преодолении стресса, так и в механизмах формирования памяти. Дальнейшие исследования в этом направлении с учетом полученных ранее данных [30] и линий с дифференциальной экспрессией CRY в разработанных нами экспериментальных условиях позволят приблизиться к пониманию роли МРП в формировании когнитивных функций и, таким образом, будут способствовать применению неинвазивных методов в терапии патологий формирования памятного следа.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411629-7-3.1.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобашев М.Е. // О направленном формировании свойств высшей нервной деятельности в онтогенезе. Труды I и II совещания "Вопросы физиологии сельскохозяйственных животных". М.-Л., 1957, с. 33–39.
2. Лобашев М.Е., Савватеев В.Б. // Физиология суточного ритма животных. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1959. 259 с.
3. Agrawal P., Houl J.H., Gunawardhana K.L., Liu T., Zhou J., Zoran M.J., Hardin P.E. // *Curr Biol*. 2017. V. 16. P. 2431–2441.
4. Karki N., Vergish S., Zoltovski B.D. // *Protein Science*. 2021. V. 30. № 8. P. 1521–1534.
5. Thöni V., Oliva R., Mauracher D., Egg M. // *Chronobiology International*. 2021. V. 38. № 8. P. 1120–1134.
6. Zatsepina O.G., Nikitina E.A., Shilova V.Y., Chuva-kova L.N., Sorokina S., Vorontsova J.E., Tokmacheva E.V., Funikov S.Y., Rezyukh A.P., Evgen'ev M.B. // *Cell Stress and Chaperones*. 2021. V. 26. № 3. P. 575–594.
7. Damulewicz M., Mazzotta G.M. // *Front Physiol*. 2020. V. 11. Art. 99.
8. Никитина Е.А., Васильева С.А., Щеголев Б.Ф., Савватеева-Попова Е.В. // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2022. Т. 72. № 6. С. 783–799.
9. Solov'yov I.A., Domratcheva T., Schulten K. // *Scientific Reports*. 2014. V. 4. Art. 3845.
10. Vasilieva S.A., Tokmacheva E.V., Medvedeva A.V., Ermilova A.A., Nikitina E.A., Shchegolev B.F., Surma S.V., Savvateeva-Popova E.V. // *Cell and Tissue Biology*. 2020. V. 14. № 3. P. 178–189.
11. Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. // *Learning and Memory*. 1999. V. 6. № 1. P. 1–20.
12. Журавлев А.В., Никитина Е.А., Савватеева-Попова Е.В. // Успехи физиол. наук. 2015. Т. 46. № 1. С. 76–92.
13. Redt-Clouet C., Trannoy S., Boulanger A., Tokmacheva E., Savvateeva-Popova E., Parmentier M-L., Preat T., Dura J-M. // *European Journal of Neuroscience*. 2012. V. 35. P. 1684–1691.
14. Никитина Е.А., Журавлев А.В., Савватеева-Попова Е.В. // *Интегративная физиология*. 2021. Т. 2. № 1. С. 49–60.
15. Никитина Е.А., Медведева А.В., Герасименко М.С., Проников В.С., Сурма С.В., Щеголев Б.Ф., Савватеева-Попова Е.В. // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2017. Т. 67. № 2. С. 246–256.
16. Ortega-de San Luis C., Ryan T.J. // *JBC Reviews*. 2022. V. 298. № 101866. P. 1–23.
17. Surma S.V., Belostotskaya G.B., Shchegolev B.F., Stefanov V.E. // *Bioelectromagnetics*. 2014. V. 35. P. 537–546.
18. Stutzmann G.E., Mattson M.P. // *Pharmacol Rev*. 2011. V. 63. № 3. P. 700–727.
19. Медведева А.В., Реброва А.В., Заломаева Е.С., Тураева С.К., Никитина Е.А., Токмачева Е.В., Васильева С.А., Щеголев Б.Ф., Савватеева-Попова Е.В. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2022. Т. 58. № 1. С. 34–42.
20. Zhang B., Lu H., Xi W., Zhou X., Xu S., Zhang K., Jiang J., Li Y., Guo A. // *Neuroscience Letters*. 2004. V. 371. P. 190–195.
21. Yu C-J., Gao Y., Willis C.L., Li P., Tiano J.P., Nakamura P.A., Hyde D.R., Li L. // *Journal of Neuroscience Research*. 2007. V. 85. P. 488–496.
22. Dusik V., Senthilan P.R., Mentzel B., Hartlieb H., Wülbeck C., Yoshii T. et al. // *PLoS Genet*. 2014. V. 10. № 8. Art. e1004565.
23. Inami S., Sato S., Kondo S., Tanimoto H., Kitamoto T., Sakai T. // *Journal of Neuroscience*. 2020. V. 40. № 7. P. 1427–1439.
24. Yin J.C.P., Cui E., Hardin P.E., Zhou H. // *Front Syst Neurosci*. 2023. V. 17. Art. 1129152.
25. Sarimov R.M., Serov D.A., Gudkov S.V. // *Biology*. 2023. V. 12. Art. 1513.
26. Rodgers C.T., Hore, P.J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. V. 106. P. 353–360.
27. Abeyrathne C.D., Halgamuge M.N., Farrell P.M. // *World Acad Sci Eng Tech*. 2010. V. 64. P. 18–23.
28. Nair P.S., Zadeh-Haghighi H., Simon C. // *Scientific Reports*. 2024. V. 14. Art. 3628.
29. Thoeni E.Y., Dimova T., Kietzmann R.J., Usselman M. // *Redox Biol*. 2024. V. 72. Art. 103152.
30. Karovetskaya D.M., Medvedeva A.V., Tokmacheva E.V., Vasilyeva S.A., Rebrova A.V., Nikitina E.A., Shchegolev B.F., Savvateeva-Popova E.V. // *Neurochemical Journal*. 2024. V. 18. № 1. P. 36–46.

Long-Term Memory: The Role of Light and Learning in Coping with Stress in *Drosophila Melanogaster*

E. V. Tokmacheva¹, A. V. Medvedeva¹, B. F. Schegolev¹, E. A. Nikitina^{1, 2},
and E. V. Savvateeva-Popova¹

¹*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

²*Herzen Russian State Pedagogical University, St. Petersburg, Russia*

The formation of a conditional connection allows the organism to change its reactions to various environmental factors, combining and mobilizing the necessary internal adaptive processes. It is assumed that there are common mechanisms underlying the formation of adaptive processes – stress response and learning. To develop methods for non-invasive correction of nervous system pathologies at a model object of genetics – *Drosophila*, the relationship of adaptive mechanisms of the formation of a conditional connection and the development of a stressor reaction to the weakening of the Earth's magnetic field in light: dark conditions was studied. The role of learning and lighting in overcoming stress in connection with the formation of long-term memory in the paradigm of conditioned courtship suppression was revealed. Within the framework of quantum dynamics of electronic and nuclear spins of transition states of radical molecules, the hypothesis of their participation in the formation of long-term memory is considered.

Keywords: learning, memory, cryptochromes, magnetic field, lighting, radical pair mechanism

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАТЕХОЛАМИНОВ В КРОВИ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ СОСУДОВ У ДЕТЕЙ С СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ

© 2024 г. Р. Р. Нигматуллина¹, Д. И. Садыкова¹, К. Р. Салахова^{1, *}, Е. С. Сладникова^{1, 2},
Л. Р. Хуснутдинова¹

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Россия

²ГАУЗ «Детская республиканская клиническая больница» Минздрава Республики Татарстан, Казань, Россия

*E-mail: karina.salakh@mail.ru

Поступила в редакцию 24.06.2024 г.

После доработки 24.07.2024 г.

Принята к публикации 15.08.2024 г.

Катехоламины — класс химических нейромедиаторов и гормонов, занимающих ключевые позиции в регуляции различных физиологических процессов в организме человека, а также участвующих в развитии неврологических, психиатрических, эндокринных заболеваний. Особый интерес представляет изучение участия катехоламинов в формировании и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза. Перспективной моделью для исследования в этой области может стать семейная гиперхолестеринемия, которая характеризуется ранним развитием ССЗ в молодом возрасте вследствие длительного воздействия повышенных концентраций атерогенных липопротеидов на стенку артериальных сосудов. В рамках настоящей работы было проведено кросс-секционное исследование с участием двух педиатрических групп, в которые были включены пациенты с диагнозом семейная гиперхолестеринемия и условно здоровые дети без сердечно-сосудистых заболеваний. Концентрация L-3,4-дигидроксифенилаланина и дигидроксифенилуксусной кислоты в плазме крови были выше у детей с семейной гиперхолестеринемией, чем в контрольной группе. Концентрации адреналина в плазме крови в основной группе по сравнению со здоровыми были ниже на 10%. Выявлены положительные корреляционные связи между уровнем L-3,4-дигидроксифенилаланина, дигидроксифенилуксусной кислоты и показателями артериальной ригидности сосудов, а также общим холестерином. Результаты нашего исследования подтверждают, что катехоламины участвуют в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза и их биосинтез изменен у детей с семейной гиперхолестеринемией.

Ключевые слова: катехоламины, L-3,4-дигидроксифенилаланин, дигидроксифенилуксусная кислота, адреналин, норадреналин, сердечно-сосудистые заболевания, семейная гиперхолестеринемия, дети

DOI: 10.31857/S1027813324040124, EDN: EGFFAK

ВВЕДЕНИЕ

Катехоламины — химические соединения с двумя соседними гидроксильными группами в бензольном кольце [1]. В плазме крови человека содержится шесть основных катехолов. L-3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА) — предшественник катехоламинов, непосредственно сами катехоламины (дофамин (ДА), норадреналин (НА), адреналин (А)) и два их метаболита: дигидроксифенилуксусная кислота (ДОФУК) — метаболит ДА и дигидроксифенилгликоль (ДГПГ) — основной метаболит НА [1, 2].

Синтез катехоламинов начинается в центральных, периферических нейронах и в мозговом

веществе надпочечников с аминокислоты тирозина. Под действием фермента тирозингидроксилазы (ТГ) тирозин последовательно превращается в ДОФА. На следующем этапе при воздействии декарбоксилазы ароматических аминокислот (AADC) из ДОФА образуется ДА. В норадренергических нейронах симпатической нервной системы, в стволе мозга и хромаффинных клетках надпочечников ДА превращается в НА с помощью дофамин-β-гидроксилазы (ДВН). Адреналин синтезируется из НА под действием фенилэтанол-амин-N-метилтрансферазы, присутствующей в адренергических клетках мозгового вещества надпочечников и в нейронах нижних отделов

ствола мозга [3]. Подробный путь биосинтеза и деградации катехоламинов представлен на рис. 1.

ДОФА — предшественник ДА, НА, А и “ключевой игрок” в функционировании всех эффекторных систем, использующих катехоламины [2]. Концентрации ДОФА в плазме крови превышают уровни НА примерно в 10 раз вследствие более быстрого выведения последнего из плазмы. Определение концентрации ДОФА может отражать биосинтез всех катехоламинов в организме [4].

ДОФУК — продукт окисления дигидроксифенилацетальдегида. Уровни ДОФУК в плазме крови приблизительно в 50 раз выше, чем ДА, из-за гораздо более медленного выведения ДОФУК из кровообращения. Часть ДОФУК в плазме образуется в результате метаболизма ДА в цитоплазме симпатических нейронов, другая — в результате преобразования ДА в ненейрональных клетках желудочно-кишечного тракта [2].

Плазменный НА синтезируется в сети симпатических нейронов, которые оплетают кровеносные сосуды, преимущественно артериолы и проникают в различные органы человека, например в сердце и почки. В сердце симпатические нервы образуют решетчатую сеть вокруг клеток миокарда. В кровоток поступает лишь малая часть неизмененного НА, синтезированного в симпатических нейронах, так как большая его часть метаболизируется еще до попадания катехоламина в интерстициальную

жидкость или плазму. Концентрация НА в плазме крови зависит от двух составляющих: скорость высвобождения катехоламина в кровоток и скорость его выведения. В плазму НА может попадать и пассивно, просачиваясь в цитоплазму из везикулярных запасов, однако быстро рециркулируется при помощи везикулярного переносчика моноаминов. Небольшая часть НА в цитоплазме подвергается ферментативному окислительному дезаминированию, катализируемому под воздействием моноаминоксидазы (МАО) с образованием 3,4-дигидрофенилацетальдегида.

Адреналин синтезируется в клетках мозгового вещества надпочечников и попадает непосредственно в кровоток. Концентрация А в плазме крови, как правило, ниже, чем НА. В отличие от НА, уровень А в плазме крови заметно увеличивается в ответ на патологические изменения в организме, такие как гипотензия или гипогликемия. Это, по-видимому, отражает относительно большую активацию адреномедуллярной гормональной, чем симпатической норадренергической системы [2].

Катехоламины играют важную роль в физиологической регуляции сердечно-сосудистой, дыхательной, метаболической и иммунной систем [8]. Изменения концентрации катехоламинов и их функций определяются при различных заболеваниях: феохромоцитоме, болезни Паркинсона,

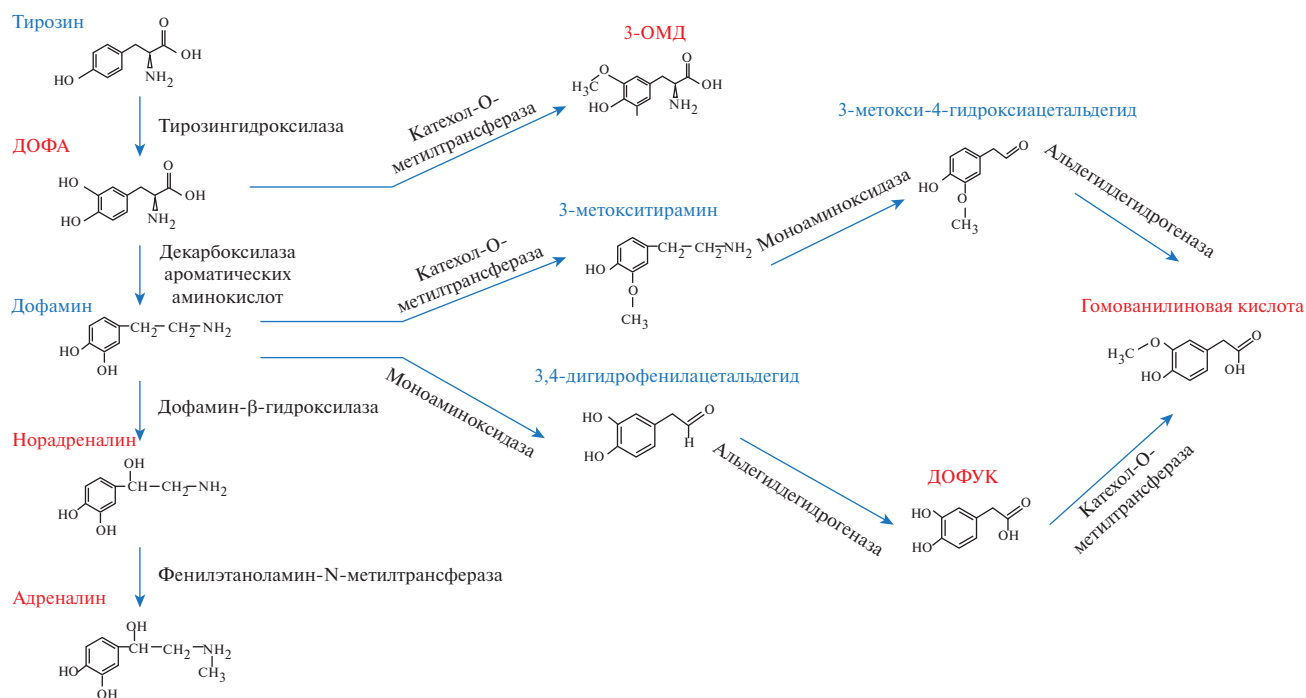


Рис. 1. Путь биосинтеза и деградации катехоламинов. Красным цветом выделены катехоламины и их метаболиты, которые были оценены в настоящем исследовании. ДОФА — L-3,4-дигидроксифенилаланин, 3-ОМД — 3-метокситирозин, ДОФУК — дигидроксифенилуксусная кислота.

шизофрении, синдроме дефицита внимания с гиперактивностью, гемолитико-уремическом синдроме [6–8].

Особенный интерес представляет изучение участия катехоламинов в развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) атеросклеротического генеза. Еще во второй половине XX века появились первые сведения о том, что развитие атеросклеротического процесса в сосудах связано с изменениями уровня катехоламинов в плазме крови [9]. Например, Н.Ж. Вауч с соавт. обнаружили, что у пациентов с ишемической болезнью сердца концентрация НА и А более чем в два раза превышали таковые в группе контроля. А, НА, ДА и некоторые их метаболиты стимулируют пролиферацию гладкомышечных клеток и клеток эндотелия, приводя к образованию атеросклеротических бляшек [10]. На моделях животных было показано, что инфузии А и НА приводят не только к прогрессирующему атеросклерозу аорты и коронарных артерий, но и к развитию инфаркта миокарда [11, 12]. Значимая роль катехоламинов в патогенезе атеросклеротического поражения сосудов в настоящее время подтверждается результатами, полученными на взрослой популяции [13]. Доказано, что у людей, подверженных факторам риска развития ССЗ (курение, стрессовые ситуации, высокое артериальное давление), пациентов с ишемической болезнью определяют более высокие значения уровня катехоламинов в плазме крови [10, 13]. В специализированной научной литературе встречаются единичные исследования, посвященные изучению концентрации катехоламинов у детей с гиперхолестеринемией. Например, у маленьких детей с феохромоцитомой были описаны случаи генерализованного атеросклероза и инфаркта миокарда [13].

Перспективной моделью для изучения роли катехоламинов в патогенезе развития атеросклероза может стать семейная гиперхолестеринемия.

Семейная гиперхолестеринемия — распространенное моногенное заболевание, протекающее с высокими концентрациями общего холестерина (ОХ) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в плазме крови [14]. Длительное воздействие повышенных концентраций атерогенных липопротеидов на стенку артериальных сосудов приводит к преждевременному развитию ССЗ в молодом возрасте [15]. По последним данным у 1 из 313 обследованных регистрируется гетерозиготная форма семейной гиперхолестеринемии [16]. Учитывая результаты многочисленных исследований, можно предположить, что количество пациентов с семейной гиперхолестеринемией в мире может составлять около 35 млн. человек, в том числе 6–8 млн. — это дети до 18 лет [17]. Известно, что в течение первых десятилетий жизни, гетерозиготная форма семейной гиперхолестеринемии, как

правило, протекает бессимптомно, соответственно клинические проявления заболевания отсутствуют. Манифестация симптомов чаще всего приходится на возраст старше тридцати лет, при этом качество жизни значительно ухудшается, а ее продолжительность сокращается в среднем на 25 лет [15].

Гиперхолестеринемия приводит к структурно-морфологическим изменениям сосудистой стенки, которые проявляются потерей эластичности и повышенной ригидностью артерий. Данные нарушения вызывают увеличение скорости пульсовых волн, поскольку они движутся быстрее в жестких артериях. Функциональные изменения в сосудах происходят задолго до первых клинических симптомов, поэтому изменение скорости пульсовой волны (СПВ) является ранним маркером субклинического атеросклероза [18]. Определение толщины комплекса “интима — медиа” сонных артерий (ТКИМ) также относят к основным методам ранней диагностики атеросклероза у детей с семейной гиперхолестеринемией. Методика информативна еще до появления клинической картины ишемической болезни сердца (ИБС) [19].

Цель исследования — оценить изменение концентрации катехоламинов в плазме крови у детей с семейной гиперхолестеринемией — как фактор риска развития атеросклеротического поражения сосудов.

Понимание механизмов, лежащих в основе развития атеросклеротического поражения сосудов у детей, позволит в будущем разработать новые биомаркеры ранней диагностики атеросклероза, а также новые классы лекарственных препаратов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кросс-секционное исследование с участием двух педиатрических групп проходило на базе республиканского центра липидологии для детей ГАУЗ “Детская республиканская клиническая больница” Министерства здравоохранения Республики Татарстан. Дети были включены в исследование и разделены на группы в соответствии с критериями включения и исключения. Критериями включения в основную группу были: 1) возраст детей от 5 до 17 лет включительно; 2) генетически подтвержденный диагноз гетерозиготной формы семейной гиперхолестеринемии. Критерии исключения: 1) установленный диагноз гомозиготной формы семейной гиперхолестеринемии; 2) применение гиполипидемических препаратов; 3) назначение препаратов, которые изменяют или взаимодействуют с моноаминергической системой; 4) противопоказания к суточному мониторингу артериального давления. В состав контрольной группы вошли условно здоровые дети в возрасте от 5 до 17 лет без ССЗ и с уровнем ОХ < 4.4 ммоль/л. Всем участникам исследования

и их законным представителям были предоставлены подробные сведения о целях, процедурах, преимуществах и потенциальных рисках исследования. Информированное согласие было подписано всеми участниками исследования или их законными представителями и все они предоставили свое письменное информированное согласие до начала участия. Исследование одобрено комитетом по этике научных исследований Казанского государственного медицинского университета (протокол № 11 от 19 декабря 2023 г.). Настоящая работа была проведена в соответствии с Кодексом этики Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация) для экспериментов с участием людей.

Всем детям был рассчитан индекс массы тела (ИМТ) по формуле “масса/рост в квадрате” ($\text{кг}/\text{м}^2$).

В исследуемых группах было проведено суточное мониторирование артериального давления с последующей оценкой ригидности сосудистой стенки при помощи программно-аппаратного комплекса Vasotens® (Петр Телегин, Нижний Новгород, Россия). С данной целью устанавливалась пневматическая манжета на плечо ребёнка, на пояс крепился аппарат BPLab®. Аппарат предварительно настраивался при помощи программы с помощью персонального компьютера. Измерения проводились в течение 24 часов, после чего аппарат снимался и собранные данные загружались на персональный компьютер. Показатели артериальной жёсткости рассчитывались при помощи программного обеспечения Vasotens® (Версия 06.02.01.15410).

Всем детям было проведено измерение толщины комплекса “интима – медиа” общей сонной артерии с обеих сторон при помощи ультразвукового сканера HD11XE (Philips, США) с использованием линейного (3–12 МГц) датчика.

Показатели липидного профиля и биохимического анализа крови определяли в сыворотке крови с использованием набора реагентов F. Hoffman La Roche (Базель, Швейцария) на автоматическом анализаторе Cobas 6000 (Roche, Базель, Швейцария).

Концентрации катехоламинов и их метаболитов в плазме крови определялись методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией.

Забор крови пациентам исследуемых групп проводился в утренние часы после ночного голодания. Для проведения лабораторных исследований использовалась венозная кровь, собранная в пробирки с этилендиаминуксусной кислотой в объеме 2 мл. Полученные образцы крови в течение 1 ч доставляли в лабораторию Детской республиканской клинической больницы для последующего центрифугирования и подготовки образцов.

Для определения концентрации катехоламинов и их метаболитов в плазме крови венозную кровь, полученную от участников исследования центрифугировали 20 минут при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ со скоростью 1500 g. Затем отделяли плазму от форменных элементов, переносили в отдельный эппендорф и хранили при температуре -80°C до проведения анализа. Содержание катехоламинов определяли методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией на хроматографе LC - 304 T (BAS, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISICA 6.0. Нормальное распределение признака констатировали при $p > 0.05$ (тест Шапиро-Уилка). Непараметрические методы статистического анализа использовали в ином случае. При нормальном распределении признака рассчитывали среднюю арифметическую (M , Mean) и 95% доверительный интервал (ДИ), при распределении признака, отличным от нормального, из мер центральной тенденции определяли медиану (Median, Me), из мер рассеяния – межквартильный размах (МКР значения 25-го и 75-го перцентилей). Относительные частоты признаков представляли в процентах (%), рядом указывали полученные абсолютные значения и общее количество пациентов в группе (n/N). Достоверность различий между группами рассчитывали с использованием t -критерия Стьюдента, критерия хи-квадрат, точного критерия Фишера (в группах с малым числом участников), U -критерия Манна-Уитни в зависимости от ситуации. Анализ связи двух признаков проводили с помощью ранговой корреляции по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В кросс-секционном исследовании приняли участие 64 ребенка в возрасте от 5 до 17 лет. В состав основной группы вошли 32 пациента с генетически подтвержденным диагнозом гетерозиготной формы семейной гиперхолестеринемии, в группу контроля – 32 ребенка без ССЗ. Группы не имели статистически значимых различий по возрасту и полу. Средний возраст детей с семейной гиперхолестеринемией составил 10 лет 4 месяца (ДИ 2.9–17.7), у их здоровых сверстников – 10 лет 7 месяцев (ДИ 2.4–18.9). В основную группу вошли 53% мальчиков (17/32), в контрольную – 59% (19/32). Всем участникам исследования была проведена оценка индекса массы тела (ИМТ) с учетом их пола и возраста с использованием критериев Z-score по рекомендациям ВОЗ [20]. Более половины детей в основной группе имели нормальные значения ИМТ – 75% (24/32), 18.75% (6/32) пациентов с наследственной дислипидемией – белково-энергетическую недостаточность (БЭН) легкой степени, а у 6.25% (2/32) была выявлена избыточная масса тела. При анализе ИМТ детей из группы контроля

были получены схожие данные. ИМТ в диапазоне нормальных значений был зарегистрирован у 68.75% (22/32) детей, 21.8% (7/32) детей были отнесены к БЭН легкой степени, а 9.3% (3/32) имели избыточную массу тела. Основные характеристики исследуемых групп представлены в таблице 1.

Всем детям был проведен общеклинический анализ крови, анализ липидного профиля, биохимический анализ крови и стандартная коагулограмма. Не было обнаружено статистически значимой разницы между двумя группами, кроме показателей липидограммы. Концентрация общего холестерина у детей с семейной гиперхолестеринемией была в 2 раза выше, чем у детей в контроле, а ЛПНП – в 2.5 раза выше, $p < 0.05$. Средний уровень липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) был ниже у детей в основной группе по сравнению с их здоровыми сверстниками, $p < 0.05$. Результаты липидограммы представлены в таблице 2.

Исследуемым пациентам было проведено точное мониторирование артериального давления с оценкой артериальной ригидности сосудов с измерением следующих параметров: скорость пульсовой

волны (СПВ), индекс аугментации (AIx) и амбулаторный индекс ригидности артерий (AASI). При сравнении полученных значений минимальной скорости пульсовой волны (СПВмин), средней скорости пульсовой волны (СПВср) и максимальной скорости пульсовой волны (СПВмакс) были обнаружены статистически значимые различия между двумя группами ($p < 0.001$). У детей с семейной гиперхолестеринемией было выявлено существенное увеличение СПВ: минимальной в 1.3 раза, средней более чем в 1.5 раза и максимальной в 1.4 раза. В соответствии с полученными результатами в исследуемых группах не было обнаружено статистически значимых различий минимального AIx (AIxmin) ($p = 0.387$) и максимального AIx (AIxmax) ($p = 0.723$). В то же время у пациентов с семейной гиперхолестеринемией по сравнению с их здоровыми сверстниками была выявлена статистически значимая разница среднего AIx (AIxср) (Me -41 [ДИ -(77–67.5)] и Me -74 [ДИ -(78.5–68.6)], $p < 0.001$). У детей из основной группы AASI был выше в 1,2 раза, $p = 0.017$.

Таблица 1. Основные характеристики исследуемых групп

	Основная группа		Группа контроля		p ¹
	М ²	ДИ	М	ДИ	
Возраст, лет	10.4	2.2–18.6	10.7	3.3–18.1	0.536
Рост, см	143	97.4–188.6	143.7	92.2–189.3	0.912
	Me ³	МКР	Me	МКР	
Вес, кг	34.5	25.5–51.5	33	23.5–60.5	0.497

¹p – уровень статистической значимости различий.
²М – среднее арифметическое, ДИ – стандартное отклонение.
³Me – медиана, МКР – межквартильный размах.

Таблица 2. Результаты липидограммы

	Основная группа		Группа контроля		p ¹
	М	ДИ	М	ДИ	
ОХ ² , ммоль/л	7.6	5.75–9.45	3.8	2.64–4.96	<0.001
ЛПВП, ммоль/л	1.3	0.74–2.86	1.6	0.91–2.29	0.016
ЛПНП, ммоль/л	5.4	3.7–7.1	2.2	1.27–3.13	<0.001
ТГ, ммоль/л	0.8	0.15–1.45	0.6	0.21–0.99	0.003

¹p – уровень статистической значимости различий.
²ОХ – общий холестерин, ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ТГ – триглицериды.

Результаты суточного мониторингирования артериального давления с последующей оценкой ригидности сосудистой стенки при помощи программно-аппаратного комплекса Vasotens® представлены в таблице 3.

В дополнении к суточному мониторингированию артериального давления всем детям также проводилось измерение ТКИМ общей сонной артерии, которое, является “золотым стандартом” в диагностике субклинического атеросклероза у пациентов с семейной гиперхолестеринемией. Было установлено статистически значимое увеличение ТКИМ общей сонной артерии у детей с семейной

гиперхолестеринемией (Ме 0.45 [МКР 0.41–0.48] мм) по сравнению с контрольной группой (Ме 0.4 [МКР 0.35–0.41] мм), $p < 0.001$.

В ходе нашего исследования были оценены следующие катехоламины и их метаболиты: ДОФА, 3-метокситирозин (3-ОМД), ДОФУК, гомованилиновая кислота (ГВК), НА и А. Основные результаты исследования и их сравнение представлены в таблице 4.

При сравнении показателей концентрации ДОФА в плазме крови у детей основной и контрольной групп было выявлено, что у пациентов с семейной гиперхолестеринемией определяются

Таблица 3. Результаты суточного мониторингирования артериального давления с последующей оценкой ригидности сосудистой стенки

Показатель	Основная группа		Группа контроля		p ¹
	Ме	МКР	Ме	МКР	
СПВ _{мин} ² , м/с	4.4	3.6–5.8	3.4	2.8–3.9	<0.001
СПВ _{ср} , м/с	7	5.8–8.1	4.3	3.7–5.1	<0.001
СПВ _{макс} , м/с	8.8	7.4–11.4	6.5	5.5–7.4	<0.001
А _х мин, %	–72.5	–(77 – 67.5)	–74	–(78.5 – 68.5)	0.387
А _х ср, %	–41	–(48 – 34)	–52.3	–(61 – 45)	<0.001
А _х макс, %	13.6	4–35	20.2	2–40.5	0.723
AASI	0.54	0.44–0.64	0.46	0.35–0.55	0.017

¹p – уровень статистической значимости различий.

²СПВ – скорость пульсовой волны, А_х – индекс аугментации, AASI – амбулаторный индекс ригидности.

Таблица 4. Значения показателей катехоламинов, их метаболитов у детей с семейной гиперхолестеринемией

Показатели	Основная группа		Группа контроля		p ¹
	Ме	МКР	Ме	МКР	
ДОФУК ² (пмоль/мл)	3.8	2.8–5.5	2.1	1.4–2.9	0.007
ГВК (пмоль/мл)	55.9	42.7–57.3	51	41.4–66.5	0.261
НА (пмоль/мл)	1.56	1.32–1.91	1.96	1.41–2.34	0.116
А (пмоль/мл)	0.9	0.7–1	1	0.8–1.5	0.028
	М	ДИ	М	ДИ	
ДОФА (пмоль/мл)	5.5	3.7–7.3	4.5	3.1–5.8	<0.001
3-ОМД (пмоль/мл)	73.3	42.7–103.9	70	33.7–106.2	0.441

¹p – уровень статистической значимости различий.

²ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, НА – норадреналин, А – адреналин, ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, 3-ОМД – 3-метокситирозин.

Таблица 5. Корреляция между ДОФА, 3-ОМД и возрастом, весом, ростом детей с семейной гиперхолестеринемией

	Возраст		Вес		Рост	
	ρ^1	p	ρ	p	ρ	p
ДОФА ²	−0.3	0.024	−0.3	0.033	−0.3	0.034
3-ОМД	−0.5	<0.001	−0.5	<0.001	−0.5	<0.001

¹ ρ – коэффициент корреляции Спирмена, p – уровень статистической значимости различий.

²ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, 3-ОМД – 3-метокситирозин.

Таблица 6. Корреляция между ДОФА, ДОФУК и инструментальными маркерами артериальной жесткости и общим холестерином у детей с семейной гиперхолестеринемией

	ТКИМ ¹		СПВср		АІхСр		ОХ	
	ρ^2	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p
ДОФА ³	0.3	0.005	0.3	0.042	0.4	0.002	0.5	<0.001
ДОФУК	0.3	0.011			0.3	0.010	0.4	<0.001

¹ТКИМ – толщина комплекса интима-медиа общей сонной артерии, СПВ – скорость пульсовой волны, АІхСр – индекс аугментации, ОХ – общий холестерин.

² ρ – коэффициент корреляции Спирмена, p – уровень статистической значимости различий.

³ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота.

более высокие значения предшественника катехоламинов. Уровень ДОФА у детей первичной дислипидемией был в 1.2 раза выше по сравнению со здоровыми сверстниками, $p < 0.001$.

У пациентов с семейной гиперхолестеринемией медиана 3-ОМД, продукта метилирования ДОФА, была выше, чем у группы контроля, однако не была статистически значима, $p = 0.441$.

Статистически значимые различия были получены и при сравнении концентрации ДОФУК, который является одним из ключевых метаболитов ДА. Концентрация ДОФУК в плазме крови у детей с семейной гиперхолестеринемией в 1.8 раз превышали значения в группе контроля, $p = 0.007$.

Медиана концентрации ГВК, основного продукта обмена ДА, на 10% была выше у пациентов с наследственной дислипидемией, однако уровни статистической разницы по сравнению со здоровыми детьми не достигала, $p = 0.261$.

У пациентов основной группы концентрации НА и А в плазме крови были ниже, чем у группы контроля на 20% и 10% соответственно, тем не менее статистически значимые различия между группами были выявлены только в отношении А, $p = 0.028$.

В процессе корреляционного анализа были выявлены отрицательные связи между концентрацией ДОФА в плазме крови и возрастом, весом

и ростом детей (табл. 5) и положительные корреляции с ОХ и с такими инструментальными маркерами артериальной ригидности, как СПВср, АІхСр, ТКИМ (табл. 6). Отрицательная связь также была обнаружена между концентрацией 3-ОМД и возрастом, весом, ростом (табл. 5) и ААСІ ($\rho = -0.3$, $p = 0.015$).

Наше исследование позволило выявить положительные корреляции между концентрацией ДОФУК в плазме крови и ОХ, ТКИМ, АІхСр (табл. 6). Кроме того, между уровнем ГВК и ТКИМ была определена отрицательная связь ($\rho = -0.3$, $p = 0.033$). Была обнаружена отрицательная корреляция между НА и ОХ ($\rho = -0.3$, $p = 0.010$), а также положительная корреляция между А и ЛПВП ($\rho = 0.4$, $p = 0.017$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего исследования показали наличие связи между уровнем катехоламинов, их метаболитов и атеросклеротическими изменениями сосудистой стенки.

ДОФА – предшественник эндогенных катехоламинов. На сегодняшний день его источник и значения в организме человека неизвестны [21]. Настоящее исследование показало, что уровни ДОФА в плазме крови у пациентов с семейной гиперхолестеринемией были выше, чем у здоровых

детей, что коррелировало с концентрацией общего холестерина в плазме и инструментальными маркерами атеросклеротических изменений сосудистой стенки. В экспериментальных работах с участием лабораторных животных было показано, что ДОФА обладает гиполипидемическим эффектом, ингибируя окисление липопротеидов низкой плотности [22]. Интраперитонеальное введение ДОФА приводило к снижению уровня общего холестерина в плазме крови, а также к уменьшению атеросклеротических изменений в аорте кроликов [23]. В другом исследовании ДОФА использовался в комплексной терапии пациентов с ишемической болезнью сердца в течение четырех недель. Результаты исследования продемонстрировали снижение концентрации атерогенных липопротеидов в плазме крови. При использовании ДОФА у больных, перенесших инфаркт миокарда, улучшались гемодинамические показатели и клиническое течение ишемической болезни сердца [24]. В ходе исследования была выявлена отрицательная связь между уровнем ДОФА и возрастом детей. Эти результаты согласуются с данными о наличии связи между ДОФА и соматотропином [25]. G. Eisenhofer с соавт. на основании результатов своей работы предположили, что ДОФА в плазме крови отражает активность тирозингидроксилазы [21]. В одном из европейских исследований, посвященных метаболической характеристике артериальной ригидности у пациентов мужского пола с заболеванием периферических артерий было выявлено, что у людей с атеросклерозом уровни тирозина были выше по сравнению с группой контроля. Была обнаружена положительная корреляция между концентрацией тирозина и уровнем оксЛПНП и СПВ [26]. Мы предполагаем, что у детей с семейной гиперхолестеринемией также будут определяться повышенные концентрации тирозина. Выявленные корреляции между метаболитом ДОФА и AASI, который является одним из инструментальных маркеров ремоделирования сосудов, подтверждают нашу гипотезу о вовлечении катехоламинов в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза.

3-ОМД является одним из двух метаболитов ДОФА, который образуется под воздействием фермента СОМТ. В настоящий момент его физиологическая роль до конца не изучена. Известно, что у пациентов с болезнью Паркинсона концентрация 3-ОМД в крови превышает физиологический уровень [27]. Однако исследования в области сердечно-сосудистых заболеваний и 3-ОМД ранее не проводились. В ходе нашей работы мы не обнаружили статистически значимых различий концентрации 3-ОМД в плазме крови у детей с семейной гиперхолестеринемией и их здоровых сверстников.

ДОФУК — основной метаболит ДА. Образование ДОФУК отражает действие двух последовательных ферментов: МАО и альдегиддегидрогеназы (ALDH). Его предшествующий промежуточный метаболит, 3,4-дигидроксифенилацетальдегид, высокотоксичен и находится в центре внимания “гипотезы катехоальдегида” о гибели катехоламиновых нейронов при болезни Паркинсона [28]. Исследований по изучению ДОФУК и его участие в патогенезе атеросклероза до этого не проводилось.

ДОФА — предшественник ДА, а ДОФУК — его основной метаболит. В ходе нашего исследования мы выявили, что эти показатели были статистически значимо выше у детей основной группы. Это косвенно позволяет предположить увеличение концентрации самого ДА в плазме крови у пациентов с семейной гиперхолестеринемией. У человека не менее 95% ДА в плазме циркулирует в сульфоконъюгированной форме. На долю ДА в организме человека приходится лишь 2–4% от всего количества катехоламинов, высвобождаемых при симпатической стимуляции. Везикулы, подвергающиеся экзоцитозу из симпатических нервов, содержат НА примерно в 25–50 раз больше, чем ДА [2]. В последние десятилетия активно начали изучаться противовоспалительные эффекты периферического дофамина [29]. Через рецепторы D1R, D2R, D4R и D5R ДА опосредует свое воздействие на сердечно-сосудистую систему. Цзяо Лю с соавт. в своем исследовании показали, что передача сигналов D1R подавляла воспаление NLRP3 в кардиомиоцитах, обработанных доксорубицином, уменьшала повреждение сердца и фиброз у мышей, получавших доксорубицин [30]. В свою очередь доказано, что внеклеточное и внутриклеточное накопление холестерина провоцирует NLRP3-зависимое воспаление при атеросклерозе [31]. В культурах желудочковых миоцитов новорожденных крыс стимуляция D2-подобных рецепторов бромкриптином ингибировала индуцированную ангиотензином II гипертрофию желудочковых миоцитов новорожденных крыс и уменьшала апоптоз в миоцитах, подвергнутых ишемии/реперфузионному повреждению [32, 33]. Показано, что воспалительные цитокины, например, IL-1 β , который играет важную роль в развитии атеросклероза, способствуют дифференцировке мезэнцефалических клеток-предшественников в дофаминергические нейроны [34, 35].

ГВК в плазме крови образуется в результате О-метилирования ДОФУК в ненейрональных клетках. Ингибирование фермента катехол-О-метилтрансферазы (СОМТ) увеличивает уровень ДОФУК при одновременном снижении концентрации ГВК [2]. ГВК выводится с мочой и в некоторых случаях используется для диагностики дефицита моноаминовых нейротрансмиттеров [3].

В нашем исследовании у детей с семейной гиперхолестеринемией концентрация ГВК в плазме крови была на 10% выше по сравнению со здоровыми детьми.

Большинство исследований, посвященных изучению участия катехоламинов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, сосредоточены на двух соединениях — НА и А. В исследованиях доказано [2], что уровни А в плазме крови, как правило, ниже, чем НА, что согласуется с нашими данными. Физиологические реакции на активацию симпатической нервной системы и мозгового слоя надпочечников опосредуются действием эндогенных катехоламинов НА и А на адренергические рецепторы. Эндогенные катехоламины выполняют в организме широкий спектр функций благодаря большому разнообразию рецепторов [36]. Существует два типа адренорецепторов: альфа (α) и бета (β). К α -адренорецепторам относятся $\alpha 1$ и $\alpha 2$, а к β -адренорецепторам — $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$ [37, 38]. Адренергические рецепторы относятся к суперсемейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR) [39]. Несмотря на то, что норадреналин оказывает более сильное влияние на α -адренорецепторы, он может стимулировать как α -, так и β -адренорецепторы. Способ влияния симпатической активации на эффекторные клетки зависит от относительного количества α - и β -адренорецепторов в клеточной мембране того или иного органа. Все пять типов адренорецепторов экспрессируются в сосудистой сети. $\alpha 1$ -адренорецепторы преимущественно встречаются в периферических артериальных кровеносных сосудах, $\beta 1$ -адренорецепторы распределены в грудной аорте, сонных, бедренных и легочных артериях, $\beta 2$ -адренорецепторы расположены в аорте и сонных артериях, $\beta 3$ -адренорецепторы — в кровеносных сосудах кожи [37].

Тромбоциты участвуют в патогенезе поражения сосудов как при атеросклерозе, так и при артериальной гипертензии. На их реактивность *in vivo* влияют различные факторы, включая активацию симпатoadреналовой системы, уровень атерогенных липопротеинов в плазме. При повреждении эндотелия в сосудах происходит адгезия тромбоцитов в субэндотелиальном слое, из тромбоцитов высвобождаются хемоаттрактанты, митогенные факторы, например серотонин. В последствии это вызывает миграцию лейкоцитов из кровотока и пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов. В зависимости от целостности эндотелия сосудов молекулы, высвобождаемые из тромбоцитов, могут быть вазорелаксантами при эндотелиальной целостности и вазоконстрикторами в присутствии эндотелиального повреждения, из-за их прямого влияния на клетки гладкой мышцы сосудов [40].

На мембране тромбоцитов преобладают $\alpha 2$ -адренорецепторы. На сегодняшний день участие $\alpha 2$ -адренорецепторов в развитии атеросклероза

остается неясным [37]. В недавнем исследовании было показано, что введение агониста $\alpha 2$ -адренорецепторов моксонидина уменьшало образование атеросклероза в дуге аорты и левой общей сонной артерии у экспериментальных мышей [41]. Катехоламины посредством своей стимуляции при низких концентрациях усиливают действие других агонистов (например, АДФ, коллагена и тромбина), а в более высоких — инициируют реакции тромбоцитов, включая агрегацию и секрецию [36, 40]. Физиологические и патологические состояния, вызывающие активацию симпатoadреналовой системы, такие как инфаркт миокарда или сердечная недостаточность, изменяют популяцию циркулирующих тромбоцитов и модулируют их реактивность за счет увеличения циркулирующих катехоламинов [40]. Н.Г. Ардли с соавт. в своем исследовании обнаружили, что эндогенные катехоламины при минимальных концентрациях в присутствии серотонина усиливают агрегацию тромбоцитов [42]. В нашей предыдущей работе [43] мы выявили, что у пациентов с семейной гиперхолестеринемией уровень серотонина в плазме крови и тромбоцитах выше, чем у здоровых детей. В настоящем исследовании у детей с первичной дислипидемией А были ниже, чем у группы контроля, однако, мы предполагаем, что при взаимодействии с серотонином этих концентраций достаточно для активации тромбоцитов. Также при низких концентрациях катехоламины стимулируют синтез коллагена, пролиферация которого в последующем приводит к повышению жесткости сосудов [36, 44]. Результаты нашего исследования показывают, что основные показатели, характеризующие артериальную жесткость (скорость пульсовой волны, индекс аугментации и индекс амбулаторной жесткости), достоверно различались в сравниваемых группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные подтверждают, что катехоламины участвуют в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза и их биосинтез изменен у детей с семейной гиперхолестеринемией. В результате нашего исследования мы выявили различные уровни катехоламинов и их метаболитов у детей с семейной гиперхолестеринемией в сравнении с группой условно-здоровых детей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00417, <https://rscf.ru/project/23-15-00417/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein D., Eisenhofer G., Kopin I. // Pharmacol Exp Ther. 2003. V. 305. №3. P. 800–811.
2. Goldstein D. // Clin Auton Res. 2010. V. 20. № 6. P. 331–352.
3. Rios M., Habecker B., Sasaoka T., Eisenhofer G., Tian H., Landis S., Chikaraishi D., Roffler-Tarlov S. // J Neurosci. 1999. V. 19. № 9. P. 3519–3526.
4. Goldstein D., Eisenhofer G., Garty M., Folio C., Stull R., Brush J., Sax F., Keiser H., Kopin I. // Am J Hypertens. 1989. V. 2. № 3. P. 133–139.
5. Gubbi S., Nazari M., Taieb D., Klubo-Gwiedzinska J., Pacak K. // Lancet Diabetes Endocrinol. 2020. V. 8. № 12. P. 978–986.
6. Stanford S., Heal D. // Brain Neurosci Adv. 2019. V. 3. P. 1–11.
7. Nigmatullina R., Fedoseeva T., Zemskova S., Degtyareva E., Pronina T., Khakimova G., Ugrumov M., Kudrin V. // Catecholamine Research in the 21st Century: Abstracts and Graphical Abstracts, 10th International Catecholamine Symposium, 2012, 2013. P. 139.
8. Макарова Т.П., Нигматуллина Р.Р., Кудрин В.С., Давлиева Л.А., Мельникова Ю.С., Марапов Д.И., Хуснутдинова Д.Р. // Практическая медицина. 2022. Т. 20. № 2. С. 92–97.
9. Kones R. // Angiology. 1979. V. 30. № 5. P. 327–336.
10. Bauch H., Grünwald J., Vischer P., Gerlach U., Hauss W. // Exp Pathol. 1987. V. 31. № 4. P. 193–204.
11. Kukreja R., Datta B., Chakravarti R. // Atherosclerosis. 1981. V. 40. P. 291–298.
12. Bhattacharya S., Chakravarti R., Wahi P. // Atherosclerosis. 1974. V. 20. № 2. P. 241–252.
13. Bauch H., Hauss W. // Wurzburg Chromatography Colloquium. 1989. V. 28. P. 69–77.
14. Садыкова Д.И., Салахова К.Р., Галимова Л.Ф., Слестникова Е.С., Халиуллина Ч.Д. // Вопросы современной педиатрии. 2023. Т. 22. № 3. С. 231–240.
15. Ежов М.В., Бажан С.С., Ершова А.И., Мешков А.Н., Соколов А.А., Кухарчук В.В., Гуревич В.С., Воевода М.И., Сергиенко И.В., Шахтштейндер Е.В., Покровский С.Н., Коновалов Г.А., Леонтьева И.В., Константинов В.О., Щербакова М.Ю., Захарова И.Н., Балахонова Т.В., Филиппов А.Е., Ахмеджанов Н.М., Александрова О.Ю., Липовецкий Б.М. // Атеросклероз. 2019. Т. 15. № 1. С. 58–98.
16. Beheshti S., Madsen C., Varbo A., Nordestgaard B. // J Am Coll Cardiol. 2020. V. 75. № 20. P. 2553–2566.
17. Mainieri F., Tagi V., Chiarelli F. // Biomedicines. 2022. V. 10. №5. P. 1043.
18. Галимова Л.Ф., Садыкова Д.И., Слестникова Е.С., Марапов Д.И., Гусева Н.Э., Халиуллина Ч.Д. // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2022. Т. 101. № 2. С. 44–49.
19. Садыкова Д.И., Галимова Л.Ф., Леонтьева И.В., Слестникова Е.С. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018. Т. 63. № 5. С. 152–154.
20. ВОЗ. Ожирение и избыточная масса тела. Доступно онлайн: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (дата обращения: 07.06.2024)
21. Eisenhofer G., Brush J., Cannon R., Stull R., Kopin I., Goldstein D. // J Clin Endocrinol Metab. 1989. V. 68. №2. P. 247–255.
22. Exner M., Hermann M., Hofbauer R., Kapiotis S., Gmeiner B. // Free Radical Research. 2003. V. 37. № 11. P. 1147–1156.
23. Mosina I., Ryzhenkov V. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 1981. V. 91. P. 268–270.
24. Okunevich I. J Pharmaceutics and Pharmacology Research. 2021. V. 4. № 1. P. 1–3.
25. Hayek A., Crawford J. // J Clin Endocrinol Metab. 1972. V. 34. № 5. P. 764–766.
26. Zagura M., Kals J., Kilk K., Serg M., Kampus P., Eha J., Soomets U., Zilmer M. // Hypertens Res. 2015. V. 38. № 12. P. 840–846.
27. Onzawa Y., Kimura Y., Uzuhashi K., Shirasuna M., Hirotsawa T., Taogoshi T., Kihira K. // Biol Pharm Bull. 2012. V. 35. № 8. P. 1244–1248.
28. Goldstein D., Kopin I., Sharabi Y. // Pharmacol Ther. 2014. V. 144. № 3. P. 268–282.
29. Moore S., Vaz de Castro P., Yaqub D., Jose P., Armando I. // Int J Mol Sci. 2023. V. 24. № 18. P. 13816.
30. Liu J., Jin Y., Wang B., Wang Y., Zuo S., Zhang J. // Biochem Biophys Res Commun. 2021. V. 561. P. 7–13.
31. Bäck M., Yurdagul A., Tabas I., Öörni K., Kovanen P. // Nat Rev Cardiol. 2019. V. 16. № 7. P. 389–406.
32. Li H., Shi S., Sun Y., Zhao Y., Li Q., Li H., Wang R., Xu C. // Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009. V. 36. № 3. P. 312–318.
33. Li H., Guo J., Gao J., Han L., Jiang C., Li H., Bai S., Zhang W., Li G., Wang L., Li H., Zhao Y., Lin Y., Tian Y., Yang G., Wang R., Wu L., Yang B., Xu C. // J Biomed Sci. 2011. V. 18. № 1. P. 18.

34. Mai W., Liao Y. // *Front Immunol.* 2020. V. 11. P. 589654.
35. Ling Z., Potter E., Lipton J., Carvey P. // *Exp Neurol.* 1998. V. 149. №2. P. 411–423.
36. Amadio P., Zarà M., Sandrini L., Ieraci A., Barbieri S. // *Int J Mol Sci.* 2020. V. 21. № 20. P. 7560.
37. Wang Y., Anesi J., Maier M., Myers M., Oqueli E., Sobey C., Drummond G., Denton K. // *Int J Mol Sci.* 2023. V. 24. № 17. P. 13132.
38. Нигматуллина Р.Р., Земскова С.Н., Зефилов А.Л., Смирнов А.В. // *Клеточно-молекулярные механизмы функционирования и регуляции сердца.* Казань: Б. и., 2004. 100 с.
39. Motiejunaite J., Amar L., Vidal-Petiot E. // *Ann Endocrinol (Paris).* 2021. V. 82. P. 193–197.
40. Anfossi G., Trovati M. // *Eur J Clin Invest.* 1996. V. 26. № 5. P. 353–370.
41. Wang Y., Nguyen D., Anesi J., Alramahi A., Witting P., Chai Z., Khan A., Kelly J., Denton K., Golledge J. // *Int J Mol Sci.* 2023. V. 24. № 4. P. 3857.
42. Ardlie N., McGuinness J., Garrett J. // *Atherosclerosis.* 1985. V. 58. P. 251–259.
43. Sadykova D., Nigmatullina R., Salakhova K., Slastnikova E., Galimova L., Khaliullina Ch., Valeeva I. // *Int J Mol Sci.* 2024. V. 25. № 2. P. 767.
44. Ecobici M., Stoicescu C. // *Maedica (Bucur).* 2017. V. 12. № 3. P. 184–190.

Changes in the Concentration of Catecholamines in the Blood as a Risk Factor for the Development of Atherosclerotic Vascular Damage in Children with Family Hypercholesterolemia

R. R. Nigmatullina¹, D. I. Sadykova¹, K. R. Salakhova¹, E. S. Slastnikova^{1, 2},
and L. R. Khusnutdinova¹

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia

²Children's Republican Clinical Hospital, Kazan, Russia

Catecholamines are a class of chemical neurotransmitters and hormones that occupy key positions in the regulation of various physiological processes in the human body, as well as those involved in the development of neurological, psychiatric, and endocrine diseases. Today, of particular interest is the study of the participation of catecholamines in the formation and progression of cardiovascular diseases of atherosclerotic origin. A promising model for research in this area may be familial hypercholesterolemia, which is characterized by the early development of CVD at a young age due to prolonged exposure to elevated concentrations of atherogenic lipoproteins on the wall of arterial vessels. As part of this work, a cross-sectional study was conducted with the participation of two pediatric groups, which included patients diagnosed with familial hypercholesterolemia and apparently healthy children without cardiovascular diseases. Plasma concentrations of L-3,4-dihydroxyphenylalanine and dihydroxyphenylacetic acid were higher in children with familial hypercholesterolemia than in the control group. Concentrations of adrenaline in blood plasma in the main group compared to healthy people were 10% lower. Positive correlations were revealed between the level of L-3,4-dihydroxyphenylalanine, dihydroxyphenylacetic acid and indicators of arterial vascular stiffness, as well as total cholesterol. The results of our study confirm that catecholamines are involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases of atherosclerotic origin and their biosynthesis is altered in children with familial hypercholesterolemia.

Keywords: catecholamines, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, dihydroxyphenylacetic acid, adrenaline, norepinephrine, cardiovascular diseases, familial hypercholesterolemia, children

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 612.8

СИГНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОГО ОТБОРА В ГЕНЕ C-KIT LIGAND СВЯЗАН С РЕГУЛЯЦИЕЙ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МЕХАНИЗМЫ ДОМЕСТИКАЦИИ

© 2024 г. А. К. Пискунов¹, В. Н. Воронкова¹, Э. А. Солошенко¹, Н. Ю. Саушкин²,
Ж. В. Самсонова^{1, 2, *}, Ю. А. Столповский¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: jvsamsonova@gmail.com

Поступила в редакцию 04.06.2024 г.

После доработки 11.06.2024 г.

Принята к публикации 13.06.2024 г.

Доместикация — одно из удивительных явлений природы, во многом определившее эволюцию человека и животных. Научный интерес к доместикации огромен и продолжает расти. Следы эволюционного отбора обнаруживают в генах, связанных с окрасом, продуктивностью, климатической адаптацией, но крайне редко — с поведением, хотя именно его особенности определяют одомашненность. Данный парадокс разрешим, если предположить, что связанные с поведением гены уже обнаружены, но относятся исследователями к другим категориям. Мы изучили эту гипотезу, используя открытые геномные и транскриптомные данные, на примере гена пигментации *KITLG*, поскольку он чаще других упоминается в связи с доместикацией. Анализ межпопуляционной ковариации *KITLG* и генов-кандидатов в геноме домашней козы (*Capra hircus*) выявил 8 эволюционно-связанных с *KITLG* генов, которые были классифицированы в три категории как элементы, регулирующие (i) сигнал глюкокортикоидов (ГК), (ii) реализацию и (iii) контроль процессов структурной нейропластичности. В мозге человека регионарный профиль соответствующих им транскриптов был комплементарен и наиболее высок в структурах, связанных с социальным взаимодействием. Предложена гипотеза, согласно которой мутация *KITLG* снижала порог чувствительности данных областей к запуску ГК-опосредованной нейропластичности, улучшая восприятие и обработку социальных стимулов. Ассоциация аллеля с пятнистой окраской ускорила его отбор, а индивидуальность её паттерна обеспечивала избирательность социальных контактов. Таким образом, геномная вариация доместицированных животных, по-видимому, в большей степени связана с поведением, чем предполагалось ранее. Её дальнейшее изучение поможет сформировать более обоснованное понимание функциональных особенностей нервной системы животных и человека.

Ключевые слова: глюкокортикоиды, нейропластичность, доместикация, лимбическая система, *KITLG*

DOI: 10.31857/S1027813324040135, **EDN:** EGDZDE

ВВЕДЕНИЕ

В гене *c-kit ligand* (*KITLG*) признаки эволюционного отбора наблюдаются практически у всех одомашненных видов животных. Продукт гена — цитокин, действуя через рецепторную тирозин-киназу, регулирует активацию, пролиферацию, дифференцировку и миграцию различных типов клеток, в том числе, предшественников меноцитов. Распространенная мутация в гене *KITLG* ассоциирована с появлением характерных для разных видов доместицированных животных паттернов окраса,

с чем традиционно связывают его роль в доместикации [1]. Но ценность такого отбора на ранних этапах одомашнивания не очевидна, а предположение о его роли в адаптации к солнечному излучению не объясняет отбор конкретных аллелей исключительно у одомашненных животных.

Аллельный вариант какого-либо гена, дающий преимущество в адаптации, будет, таким образом, чаще встречаться в популяции. Поэтому исследование межпопуляционной аллельной вариации может служить инструментом изучения механизмов адаптации. Козы являются удачным объектом

для изучения генетических взаимосвязей, возникших в ходе одомашнивания. Этот вид животных был одомашнен одним из первых, однако сохранил высокое генетическое разнообразие, поскольку не подвергался интенсивному искусственному отбору. Международным сообществом по изучению и охране генетических ресурсов создан набор полногеномных данных домашней козы. Он включает генотипы более 5000 животных из почти 200 популяций, распределённых по земному шару [2]. В него входят как древние, так и современные породы. Таким образом, этот набор данных может быть использован для поиска аллельной вариации, связанной с действием эволюционного отбора.

Цель работы состояла в исследовании гипотезы о возможной роли *KITLG* в формировании одомашненного поведения. Для этого использовали три подхода. Во-первых, в геноме домашних коз были идентифицированы гены-регуляторы церебральных процессов, среди которых на основе общности дисперсии в межпопуляционном распределении аллелей были найдены эволюционно связанные с *KITLG*. Во-вторых, на основе открытых данных была проанализирована экспрессия мРНК ортологов обнаруженных генов в мозге человека с целью выявить структура, в которых экспрессия *KITLG* была бы высока и коррелировала с экспрессией одного или нескольких из отмеченных генов. В-третьих, на основе опубликованных работ были проанализированы структурно-функциональные характеристика данных генов и связанных с ними сигнальных путей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ генетической вариации у домашней козы. Был использован комбинированный набор геномных данных из нашей предыдущей работы, который содержит 38 276 SNP от 5176 животных 188 популяций домашней козы [3]. Генотипирование всех популяций проведено с помощью Goat 50K BeadChip (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). С помощью PLINK 1.9 в хромосомных координатах, полученных из генома козы, аннотированного в Ensembl (сборка ARS1), был проведен поиск одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) в гене *KITLG* и 30 генах, потенциально связанных с подведением (табл. 1). В него вошли ортологи генов человека, связанных с выраженностью черт личности, гены рецепторов и транспортеров серотонина и дофамина, окситоцина и его рецепторов, рецепторов эстрогенов, ферменты биосинтеза стероидов. Частоты минорных аллелей (MAF) были рассчитаны для идентифицированных SNP-маркеров в мировой популяции, а также для каждой популяции животных, состоящей не менее чем из 10 особей. Число таких популяций составило 178 со средним числом животных 59 ± 2.2 ($M \pm SEM$). Для всех

популяций минорным всегда считали один и тот же аллель исходя из его частоты в мировой выборке, даже если он являлся преобладающим в конкретной популяции. Среднее значение (M), стандартное отклонение (SD), стандартная ошибка среднего (SEM), асимметрия и эксцесс были рассчитаны для оценки статистического распределения частоты минорного аллеля изучаемых генов (табл. 1).

Анализ экспрессии мРНК в мозге человека. Данные об экспрессии мРНК в головном мозге шести доноров были предоставлены Allen Human Brain Atlas [4]. Согласно описанию, образцы ткани для выделения мРНК получали путём последовательной диссекции. На первом этапе были получены срезы головного мозга толщиной 0.5–1 см, которые разделяли на блоки и сохраняли при -80°C . Далее на криостатах получали срезы толщиной 25 мкм. Срезы (через один) использовали для гистологического окрашивания либо дальнейшей макродиссекции вручную или/и лазерной микродиссекции. Макродиссекция вручную использовалась для относительно крупных и легко идентифицируемых структур мозга, лазерную микродиссекцию использовали для более мелких структур и структур неправильной формы, которые требовали микроскопической визуализации. Области, в которых образцы отбирали с помощью макродиссекции, включали кору головного мозга и мозжечка, а также крупные подкорковые ядра правильной формы, такие как хвостатое тело, скорлупа и бледный шар. Образцы других подкорковых ядер, в частности, миндалевидных тел, таламуса и гипоталамуса, а также ядер мозжечка, были отобраны с помощью лазерной микродиссекции. Нейроанатомические структуры были идентифицированы на основе гистологического окрашивания срезов по Нисслю или серебром. При макродиссекции иссекали от 50 до 200 мг ткани в зависимости от региона. Размеры корковых образцов в среднем составляли 100 мг. При лазерной микродиссекции извлекались образцы со средним объёмом 3.6 мм^2 . Всего на каждое полушарие головного мозга было около 500 образцов. Более подробно эти процедуры, методы выделения мРНК, использование микрочипов, нормализация данных экспрессии, а также данные доноров доступны на интернет-странице проекта (Allen Human Brain Atlas, раздел Documentation). Онтология и номенклатура микроструктур была составлена в соответствии с несколькими источниками и описывается на сайте проекта в подразделе “Ontology and Nomenclature”. Для получения численных данных на главной странице атласа мозга выбирали опцию “Human brain”, затем “Microarray”, в поисковом окне вводили названия интересующих генов и для результатов поиска выбирали вид цветовой шкалы интенсивности экспрессии с разрешением до микроструктур, затем выбирали опцию “Download data”. Значения экспрессии представлены в виде нормализованных

Таблица 1. Характеристика распределения частот минорных аллелей

SNP	M	SD	SEM	Асимметрия	Экссесс
<i>ABC_B1_SNP_1</i>	0.48	0.23	0.02	−0.21	−0.43
<i>ABC_B1_SNP_2</i>	0.14	0.14	0.01	1.33	1.42
<i>ANKK1</i>	0.24	0.17	0.01	0.74	0.03
<i>APOE_1</i>	0.39	0.23	0.02	0.18	−0.71
<i>APOE_2</i>	0.31	0.19	0.01	0.62	0.30
<i>BDNF</i>	0.16	0.14	0.01	1.23	1.83
<i>CDH13_11</i>	0.46	0.18	0.01	0.09	−0.11
<i>CDH13_12</i>	0.23	0.19	0.01	1.12	1.15
<i>CDH13_13</i>	0.40	0.22	0.02	0.14	−0.60
<i>CNR1_1</i>	0.21	0.23	0.02	0.96	−0.23
<i>CNR1_2</i>	0.33	0.19	0.01	0.62	−0.06
<i>COMT_1</i>	0.22	0.18	0.01	1.07	1.19
<i>COMT_2</i>	0.42	0.26	0.02	0.26	−0.87
<i>CYP11A1</i>	0.22	0.22	0.02	1.02	0.00
<i>CYP17A1A_SNP_1</i>	0.35	0.35	0.03	0.49	−1.25
<i>CYP17A1A_SNP_2</i>	0.33	0.33	0.02	0.63	−1.00
<i>CYP19A1</i>	0.35	0.19	0.01	0.59	0.20
<i>CYP1A1</i>	0.44	0.19	0.01	0.31	−0.32
<i>CYP26B1_SNP_1</i>	0.24	0.19	0.01	0.62	−0.20
<i>CYP26B1_SNP_2</i>	0.49	0.24	0.02	−0.01	−0.66
<i>CYP26B1_SNP_3</i>	0.34	0.23	0.02	0.62	−0.29
<i>DGKH_1</i>	0.39	0.21	0.02	0.01	−0.47
<i>DGKH_2</i>	0.46	0.25	0.02	0.18	−0.85
<i>DGKH_3</i>	0.49	0.22	0.02	0.25	−0.27
<i>DRD2_1</i>	0.43	0.19	0.01	0.19	−0.35
<i>DRD2_2</i>	0.50	0.17	0.01	−0.10	−0.08
<i>E2R_1</i>	0.43	0.30	0.02	0.66	−0.82
<i>E2R_2</i>	0.32	0.24	0.02	0.66	−0.39
<i>E2R_3</i>	0.43	0.30	0.02	0.47	−0.98
<i>E2R_4</i>	0.48	0.28	0.02	−0.16	−1.13
<i>E2R_5</i>	0.41	0.29	0.02	0.09	−1.28
<i>FAAH_1</i>	0.43	0.24	0.02	0.25	−0.79
<i>FAAH_2</i>	0.20	0.19	0.01	0.95	−0.18
<i>GABRA2_1</i>	0.44	0.26	0.02	0,12	−0,95
<i>GABRA2_2</i>	0.42	0.18	0.01	−0.10	0.25
<i>HSD11B1_1</i>	0.48	0.20	0.02	−0.42	−0.50
<i>HSD11B1_2</i>	0.35	0.26	0.02	0.18	−0.95
<i>HTR2A</i>	0.44	0.26	0.02	0.22	−0.67
<i>KITLG</i>	0.23	0.27	0.02	1.06	0.03
<i>LEP_1</i>	0.41	0.21	0.02	0.39	−0.11

Окончание таблицы 1 на стр. 424

Таблица 1. (окончание)

SNP	M	SD	SEM	Асимметрия	Экссесс
<i>LEP_2</i>	0.12	0.16	0.01	1.95	4.13
<i>NPY</i>	0.46	0.21	0.02	−0.02	−0.44
<i>OXT_1</i>	0.40	0.21	0.02	0.31	−0.45
<i>OXT_2</i>	0.36	0.19	0.01	0.23	−0.11
<i>OXTR_1</i>	0.43	0.25	0.02	0.25	−0.78
<i>OXTR_2</i>	0.37	0.19	0.01	0.45	0.12
<i>P2RX7_1</i>	0.22	0.18	0.01	0.86	−0.05
<i>P2RX7_2</i>	0.40	0.21	0.02	−0.08	−0.17
<i>PER3</i>	0.06	0.09	0.01	3.11	15.04
<i>SLC6A4</i>	0.34	0.17	0.01	0.37	0.42

величин. Для расчета парных параметрических коэффициентов корреляции между уровнями транскриптор использовали данные одновременно всех доноров. Таким образом, учитывалась внутри- и межиндивидуальная вариация.

Факторный анализ проводили в SPSS Statistics v. 26. В использованных матрицах строки (“наблюдения”) соответствовали популяциям животных, столбцы (“переменные”) – минорным частотам аллелей. Для проверки адекватности выборки использовали критерий Кайзера-Мейера-Олкина (КМО). Число выделяемых факторов определялось собственным значением > 1. При построении факторов использовали метод главных компонент с вращением промакс с нормализацией Кайзера. Число итераций при вращении было ограничено до 15. При определении областей мозга,

синхронно экспрессирующих *KITLG* и другие гены, рассчитывали регрессионные значение фактора их общей дисперсии для микроструктур мозга.

Структурно-функциональная характеристика продуктов генетической ковариации *KITLG* составлялась на основе анализа данных литературы, включая экспериментальные и клинические работы. Определяли биохимический класс молекул, участие во внутриклеточных и межклеточных сигнальных процессах, связь генетической вариации с фенотипом ЦНС.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявление эволюционно-связанных с *KITLG* генов у домашней козы. В таблице 2 приведен результат факторного анализа частот минорных аллелей

Таблица 2. Факторный анализ частот минорных аллелей генов поведения и *KITLG* в популяциях коз (приведены факторные нагрузки)

Мера адекватности выборки Кайзера-Майера-Олкина (КМО) составила 0.73, значение критерия сферичности Бартлетта составило 4464 (p < 0.001)

	Фактор											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	% объяснённой дисперсии											
	15.2	14.3	6.3	4.4	4.2	4.1	3.3	3.2	3.1	3.1	2.9	2.8
<i>KITLG</i>	0.91	0.15	−0.07	−0.20	0.01	−0.16	−0.05	0.01	0.08	−0.02	0.09	−0.05
<i>CNR1_1</i>	0.84	−0.17	0.07	−0.02	0.13	0.13	0.02	−0.12	−0.05	−0.05	0.19	−0.02
<i>FAAH_2</i>	0.83	−0.02	0.06	0.07	0.30	−0.21	0.03	0.20	0.10	−0.21	−0.10	−0.14
<i>DGKH_2</i>	0.75	−0.08	−0.02	−0.27	0.11	−0.09	−0.03	0.09	0.12	0.01	−0.24	0.02
<i>CYP11B1_2</i>	−0.69	−0.46	−0.09	0.03	0.39	−0.11	−0.05	−0.14	0.02	0.06	−0.01	−0.10
<i>CYP26B1</i>	−0.64	−0.09	−0.03	0.06	−0.31	−0.17	−0.15	0.19	−0.09	0.33	0.01	0.09

Окончание таблицы 2 на стр. 425

Таблица 2. (окончание)

	Фактор											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>P2RX7_1</i>	0.62	−0.27	−0.09	0.13	−0.17	0.33	−0.02	0.12	0.23	0.06	0.14	−0.08
<i>HSD11B1_1</i>	−0.57	−0.18	0.03	−0.02	−0.09	−0.11	0.00	0.40	0.20	0.25	−0.08	0.14
<i>GABRA2</i>	−0.55	0.30	0.00	0.28	0.16	0.02	0.05	0.08	0.38	0.05	−0.05	−0.02
<i>CDH13_12</i>	0.53	0.00	0.00	0.38	0.21	−0.04	−0.09	−0.03	−0.14	0.05	−0.04	0.02
<i>DRD2_2</i>	−0.18	−0.79	0.06	−0.30	0.30	0.03	0.08	0.20	0.10	−0.02	0.12	0.10
<i>LEP_2</i>	−0.08	0.76	−0.01	−0.17	0.14	−0.21	−0.13	0.20	0.10	0.06	0.13	−0.05
<i>COMT_2</i>	0.35	0.73	−0.02	0.01	0.11	−0.07	0.06	0.02	0.02	0.21	0.05	0.21
<i>PER3</i>	0.13	0.64	0.04	−0.19	−0.17	0.08	−0.09	−0.09	0.16	0.18	−0.02	−0.17
<i>ABC_B1_SNP_1</i>	0.18	−0.58	−0.07	−0.08	−0.05	−0.22	−0.04	−0.02	−0.06	0.19	−0.13	−0.01
<i>APOE_1</i>	−0.53	0.54	0.03	−0.06	−0.11	0.00	0.14	−0.08	−0.16	0.11	−0.05	−0.13
<i>COMT_1</i>	−0.26	0.48	0.05	0.10	0.22	0.09	0.10	0.06	−0.17	0.21	0.03	0.31
<i>CYP17A1A_2</i>	−0.08	0.43	−0.18	0.00	0.34	0.17	−0.18	0.32	−0.23	−0.28	−0.30	0.06
<i>E2R_4</i>	0.03	−0.01	0.93	0.05	0.01	−0.13	0.23	0.00	−0.08	0.01	−0.04	−0.04
<i>E2R_1</i>	0.00	−0.03	−0.92	−0.09	−0.07	−0.03	0.00	−0.04	0.07	−0.12	−0.03	0.28
<i>E2R_3</i>	−0.01	−0.04	−0.88	−0.02	0.04	0.09	0.19	−0.02	−0.08	−0.04	0.00	0.14
<i>E2R_5</i>	−0.03	−0.08	0.62	−0.04	0.06	0.05	−0.53	−0.08	−0.05	0.01	−0.06	0.07
<i>SLC6A4</i>	−0.28	−0.03	0.04	0.88	0.26	0.44	−0.02	0.06	0.11	0.01	−0.06	−0.12
<i>FAAH_1</i>	−0.01	−0.05	0.08	0.78	0.17	−0.26	0.12	0.01	0.10	−0.22	0.11	0.05
<i>DGKH_3</i>	−0.28	0.04	−0.05	0.53	−0.41	−0.02	−0.02	−0.13	−0.02	−0.26	0.06	0.22
<i>HSD11B1_2</i>	0.32	−0.25	−0.03	0.35	−0.18	−0.29	0.03	0.16	−0.08	−0.07	−0.27	−0.07
<i>ABC_B1_2</i>	0.24	0.02	0.06	0.28	0.84	0.00	−0.15	0.03	0.02	−0.26	0.03	0.00
<i>HTR2A</i>	−0.04	0.35	−0.07	0.16	0.49	−0.14	−0.03	−0.17	0.38	0.11	0.01	−0.06
<i>DRD2_1</i>	−0.11	−0.02	0.25	−0.17	−0.34	0.22	0.28	0.02	0.13	−0.16	−0.13	0.19
<i>ANKK1</i>	−0.04	0.16	−0.03	−0.29	0.33	0.03	−0.03	−0.28	0.30	0.03	0.00	0.04
<i>P2RX7_2</i>	0.26	−0.10	−0.10	0.01	−0.08	0.78	−0.18	0.10	−0.07	0.15	0.23	0.04
<i>APOE_2</i>	−0.22	0.13	−0.06	0.08	0.05	0.77	0.04	0.00	0.04	0.01	0.00	−0.16
<i>OXTR_1</i>	−0.03	−0.06	0.09	0.12	−0.15	−0.02	0.93	−0.03	−0.08	0.02	0.05	−0.25
<i>E2R_2</i>	0.04	0.11	0.45	0.11	0.10	0.13	−0.76	0.00	0.10	0.06	−0.01	0.05
<i>OXTR_2</i>	−0.03	−0.07	0.07	0.13	0.30	0.10	0.33	−0.03	−0.31	0.21	0.09	−0.07
<i>CDH13_9</i>	−0.10	0.00	0.00	−0.04	−0.02	−0.06	0.04	−0.93	−0.04	−0.02	0.16	0.25
<i>GABA2</i>	0.00	0.19	0.02	0.00	−0.02	0.02	0.08	0.64	0.52	−0.11	0.27	−0.06
<i>BDNF</i>	0.16	0.03	−0.03	0.12	0.03	0.02	−0.10	0.18	0.98	0.18	0.27	0.13
<i>NPY</i>	0.38	−0.11	−0.03	0.18	0.27	−0.08	0.07	0.00	−0.24	−0.90	0.21	0.08
<i>CYP11B1_1</i>	0.30	0.26	0.10	−0.27	−0.02	0.17	0.09	0.02	−0.07	0.43	0.03	−0.03
<i>CNR1_2</i>	0.34	−0.10	0.08	0.33	0.01	−0.17	0.13	−0.14	0.39	0.41	−0.09	0.15
<i>DGKH_1</i>	0.13	0.06	−0.03	0.04	0.04	0.16	0.07	−0.08	0.36	−0.18	0.93	0.07
<i>LEP_1</i>	−0.37	0.12	0.05	−0.04	−0.11	−0.34	−0.05	0.02	−0.13	−0.21	0.50	−0.18
<i>OXT_2</i>	−0.10	−0.05	−0.35	0.00	−0.08	−0.07	−0.24	−0.22	0.17	−0.02	0.04	0.77
<i>OXT_1</i>	−0.06	−0.07	0.48	−0.09	0.04	−0.12	−0.16	−0.12	0.04	−0.23	0.04	0.54

KITLG и генов, связанных с регуляцией поведения, в мировых популяциях домашних коз. Было выделено 12 факторов, объясняющих 71% совокупной дисперсии. Частота минорного аллеля *KITLG* вошла в состав первого фактора, объясняющего 15% совокупной дисперсии, что говорит о значительной доле общей изменчивости, связанной с *KITLG*. При исключении этой переменной матрица переставала быть положительно определенной. Таким образом, MAF *KITLG* определяла структуру факторной матрицы и саму возможность её построения. Это подтверждает предположение о том, что роль *KITLG* в эволюции одомашненных животных могла быть связана с регуляцией поведения. Помимо *KITLG*, в первый фактор вошли частоты аллелей 8 генов: *CYP11A1* и *HSD11B1* – генов ферментов синтеза и локального превращения глюкокортикоидов, гена *CNR1* и *FAAH* рецептора эндоканнабиноидной системы и фермента деградации его лиганда, гены *DGKH*, *P2RX7* – киназы диацилглицерола и рецептора пуринов, регулирующие активности внутриклеточных Ca^{++} -зависимых сигнальных путей, ген *GABRA2* – субъединицы рецептора ГАМК, а также ген *CDH13* – Т-кадгерина, который как и *KITLG*, является трофическим фактором и регулятором хемотаксиса в ЦНС.

Анализ экспрессии *KITLG* и эволюционно связанных с ним генов в мозге человека. В мозге человека (атлас Аллена) экспрессия отмеченных выше 8 генов и *KITLG* имела комплементарный регионарный профиль, однонаправленный с *CNR1*, *CDH13*, *DGKH*, *GABRA2*, *HSD11B1*, и разнонаправленный

с *P2RX7*, *FAAH*, *CYP11A* (табл. 3 и 4). В соответствии с модулем корреляции, в наибольшей степени с *KITLG* была связана экспрессия *HSD11B1*, *DGKH* и *FAAH* (табл. 4). На рис. 1 показано распределение латентной переменной общности дисперсии экспрессии трех указанных генов в 407 микроструктурах. Видно, что оно отклоняется от случайного: в области высоких значений выделяются две точки перегиба (0.60 и 0.95), слева от которых угол наклона функции распределения растёт – то есть значение фактора в этих структурах выше, чем можно было бы ожидать из его распределения. Число структур со значением фактора больше 0.95 составило 23 (табл. 5). В соответствии с этими данными, наибольшая высокая синхронная экспрессия данных генов наблюдалась в поясной и паратерминальной извилинах, парагиппокампальной извилине, островковой коре, передних лобно-височных корковых отделах лимбической системы, в латеральных и базолатеральных ядрах миндалины в каудальной подгруппе внутриаминарной группы ядер таламуса, амигдало-гиппокампальной переходной зоне, поле CA1 гиппокампа. Минимальная экспрессия наблюдалась в нижних отделах промежуточного мозга, ядрах лицевых нервов, белом веществе и среднем мозге в целом. В зубчатой извилине значения фактора общей дисперсии также были низкими: – 0.98 справа и – 0.86 слева.

Функциональная характеристика генетической ковариации *KITLG*. В таблице 6 приведены структурно-функциональные характеристики продуктов исследуемых генов, обнаружившие связь с *KITLG*.

Таблица 3. Корреляции нормализованных значений экспрессий генов в мозге человека (n = 417, ** – p < 0.01)

	<i>KITLG</i>	<i>GABRA2</i>	<i>CYP11A</i>	<i>HSD11B</i>	<i>CNR1</i>	<i>DGKH</i>	<i>P2RX7</i>	<i>FAAH</i>	<i>CYP11B</i>	<i>CDH13</i>
<i>KITLG</i>	1.00	.375**	–.227**	.483**	.068**	.317**	–.048**	–.265**	0.00	.328**
<i>GABRA2</i>	.375**	1.00	–.237**	.657**	.512**	.277**	–.078**	–.210**	0.01	.452**
<i>CYP11A</i>	–.227**	–.237**	1.00	–.255**	–.391**	–.168**	.100**	.173**	–.126**	–.112**
<i>HSD11B</i>	.483**	.657**	–.255**	1.00	.352**	.033*	.124**	–.134**	–.120**	.698**
<i>CNR1</i>	.068**	.512**	–.391**	.352**	1.00	.209**	–.207**	–.127**	.079**	.077**
<i>DGKH</i>	.317**	.277**	–.168**	.033*	.209**	1.00	–.300**	–.119**	.078**	–.308**
<i>P2RX7</i>	–.048**	–.078**	.100**	.124**	–.207**	–.300**	1.00	.569**	–.087**	.386**
<i>FAAH</i>	–.265**	–.210**	.173**	–.134**	–.127**	–.119**	.569**	1.00	–.045**	0.02
<i>CDH13</i>	.328**	.452**	–.112**	.698**	.077**	–.308**	.386**	0.02	–.114**	1.00

Таблица 4. Регионарные уровни экспрессии в мозге человека (нормализованные значения). В цветовом градиенте красный соответствует высоким значениям экспрессии. В нижней строке представлены коэффициенты корреляции (для всех $p < 0.01$)

structure_name	<i>KITLG</i>	<i>GABRA2</i>	<i>CDH13</i>	<i>HSD11B</i>	<i>CNR1</i>	<i>DGKH</i>	<i>P2RX7</i>	<i>FAAH</i>	<i>CYP11A</i>
dorsal thalamus	1.73	−0.74	0.01	−0.31	−2.32	0.98	0.26	0.08	0.54
occipital lobe	0.63	0.32	0.46	0.43	−0.02	−0.25	0.20	−0.34	−0.71
parietal lobe	0.56	0.39	0.66	0.67	0.18	−0.25	0.13	−0.34	−0.44
frontal lobe	0.52	0.44	0.80	0.83	0.40	−0.19	0.09	−0.23	−0.44
cingulate gyrus	0.44	0.56	0.77	0.85	0.51	−0.11	0.17	−0.22	−0.24
amygdala	0.42	1.64	0.12	0.74	0.72	0.18	−0.36	−0.03	0.33
parahippocampal gyrus	0.38	0.72	0.45	0.80	0.43	0.28	0.04	−0.08	−0.25
epithalamus	0.37	−0.83	−1.39	−1.74	−1.23	−1.39	−0.77	−0.67	1.30
temporal lobe	0.37	0.52	0.66	0.82	0.38	−0.15	0.11	−0.30	−0.54
insula	0.27	0.63	0.94	0.86	0.52	−0.01	0.11	−0.27	−0.52
claustrum	0.05	1.35	−0.08	0.86	−0.05	1.03	1.11	0.03	−0.23
hippocampal formation	−0.15	1.15	−0.55	0.15	0.56	1.04	−0.99	0.14	0.09
striatum	−0.24	0.85	−1.10	−0.25	0.86	2.11	−0.36	0.18	0.30
sulci & spaces	−0.39	−5.80	−3.47	−2.00	−3.57	−1.95	−2.79	1.57	2.41
cerebellar nuclei	−0.46	−1.55	−0.26	−1.39	−0.60	−1.06	1.15	0.68	0.74
basal forebrain	−0.51	0.81	−0.23	−0.38	0.24	0.17	−0.12	0.58	0.49
cerebellar cortex	−0.56	−1.26	−2.23	−1.52	0.66	0.78	−1.21	−0.42	−0.62
basal part of pons	−0.81	−1.67	−1.11	−0.38	−3.12	−0.75	−0.28	−0.20	2.07
myelencephalon	−0.83	−0.99	−0.05	−0.79	−0.75	−0.89	0.54	0.88	1.36
ventral thalamus	−0.83	−1.22	1.08	−0.83	−0.95	−0.81	2.17	2.33	0.56
hypothalamus	−0.88	0.17	−0.05	−0.58	−0.16	−0.61	−1.03	−0.43	0.08
mesencephalon	−0.99	−1.02	−0.08	−0.98	−0.51	−0.46	0.25	0.33	0.80
pontine tegmentum	−1.30	−0.76	−0.27	−1.02	−0.54	−1.01	0.41	0.40	1.01
white matter	−1.67	−1.78	−0.91	−2.36	−2.31	−1.88	3.46	3.33	−0.75
globus pallidus	−2.06	−0.71	−0.34	−1.09	−0.97	−1.22	2.25	1.13	0.34
subthalamus	−2.16	−1.78	0.06	−0.62	0.68	−1.51	1.28	1.57	0.40
R	<i>1</i>	<i>0.39</i>	<i>0.23</i>	<i>0.58</i>	<i>0.14</i>	<i>0.53</i>	<i>−0.40</i>	<i>−0.61</i>	<i>−0.23</i>

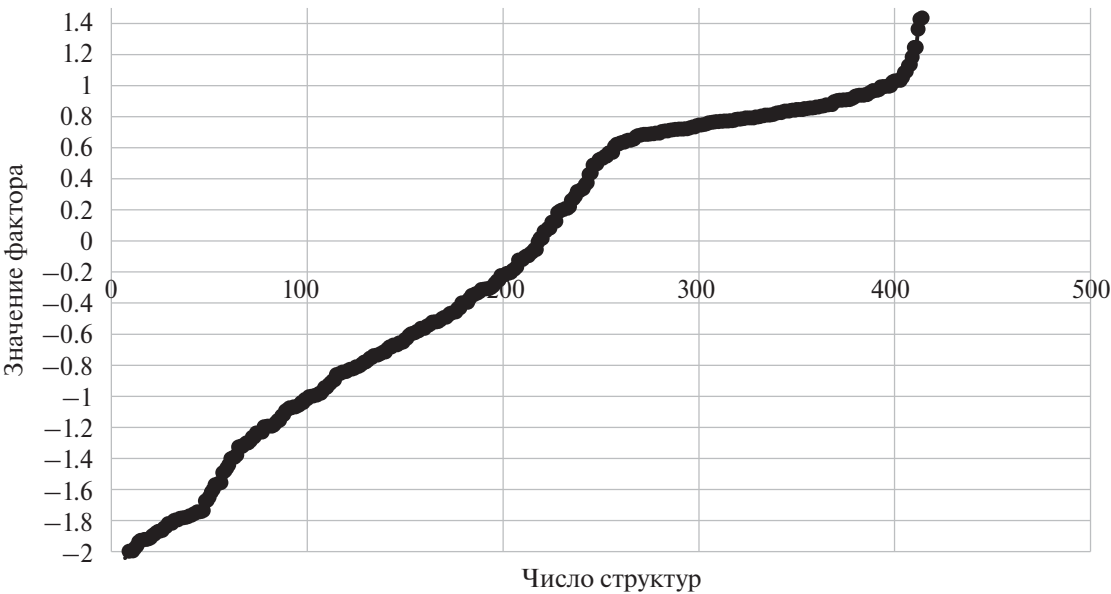


Рис. 1. Распределение значения фактора общей дисперсии уровней экспрессии мРНК генов *KITLG*, *FAAH*, *11BHSD1*, *DGKH* в микроструктурах мозга человека.

Таблица 5. Структуры с наиболее высокими значениями фактора общей дисперсии экспрессии мРНК генов *KITLG*, *FAAH*, *11BHSD1*, *DGKH* в мозге человека

Микроструктура	Нормализованная общность дисперсии для значений экспрессии <i>KITLG</i> , <i>FAAH</i> , <i>11BHSD1</i> , <i>DGKH</i>
parolfactory gyri, right	1.435756
lateral nucleus, right	1.42779
frontal pole, right, medial aspect	1.363383
frontal pole, left, medial aspect	1.245791
frontal pole, right, inferior aspect	1.245178
temporal pole, right, superior aspect	1.183644
basolateral nucleus, left	1.135082
frontal pole, right, superior aspect	1.12694
superior rostral gyrus, right	1.091031
amygdalohippocampal transition zone, right	1.082773
lateral nucleus, left	1.054398
long insular gyri, right	1.034494
basomedial nucleus, left	1.033235
medial orbital gyrus, right	1.032336
superior frontal gyrus, right, medial bank of gyrus	1.029286
inferior rostral gyrus, right	1.023999
inferior frontal gyrus, opercular part, left	0.999864
superior rostral gyrus, left	0.996167
posterior orbital gyrus, right	0.995277
inferior frontal gyrus, opercular part, right	0.994522
temporal pole, right, medial aspect	0.993474

Окончание таблицы 5 на стр. 429

Таблица 5. (окончание)

Микроструктура	Нормализованная общность дисперсии для значений экспрессии <i>KITLG</i> , <i>FAAH</i> , <i>11BHS1</i> , <i>DGKH</i>
temporal pole, left, superior aspect	0.991006
parolfactory gyri, left	0.974587
occipital pole, left, lateral aspect	0.970754
paraterminal gyrus, right	0.968393
supramarginal gyrus, right, superior bank of gyrus	0.967676
basolateral nucleus, right	0.960092
cingulate gyrus, frontal part, left, superior bank of gyrus	0.952045

Таблица 6. Структурно-функциональные характеристики *KITLG* и ассоциированных с ним генов

Ген	Продукт	Биохимические функции	Сигнальные пути, межклеточные взаимодействия. Эффекты генетической вариации на функции ЦНС (если описаны)
<i>KITLG</i>	КИТ-лиганд, фактор стволовых клеток (stem cell factor, SCF), c-kit ligand	Цитокин, агонист c-kit рецепторной тирозинкиназы. Фактор выживаемости и положительного хемотаксиса.	Сигнал положительного хемотаксиса, дифференцировки и активации. В культуре поддерживает выживание нейронов крыс и кур, которые экспрессируют рецептор c-kit [5]. В мозге наиболее высокий уровень мРНК <i>KITLG</i> обнаруживается в таламусе, неокортексе и мозжечке [6]. Кроме того, c-kit экспрессируется в нейропролиферативных зонах [7]. Рецептор <i>KITLG</i> - тирозинкиназа, активирующая регуляторную субъединицу фосфатидилинозитол-3-киназы, ключевого посредника процессов стресс-индуцированной пластичности в гиппокампе, включая нейрогенез и синаптогенез [8, 9]. Стимулирует миграцию нейрональных клеток-предшественников в зону действия стрессового фактора [10], активирует микроглию, стимулирует высвобождение везикулю.
<i>CDH13</i>	Т-кадгерин	Атипичный член семейства кадгеринов, не содержит цитоплазматический домен.	Две жирные кислоты в составе гидрофобной фосфатидил-инозитоловой группы закрепляют Т-кадгерин на клеточной мембране. Действует как сигнальный рецептор, участвующий в распознавании окружающей среды и регуляции подвижности, пролиферации и фенотипа клеток. Уровни экспрессии Т-кадгерина коррелируют с пролиферативным потенциалом клеток. Т-кадгерин выступает в роли отрицательного сигнала хемотаксиса. Действует как негативный регулятор роста аксонов во время нейрональной дифференцировки [11]. Генетическая вариация связана с аутизмом и синдромом дефицита внимания/гиперактивности [12].

Продолжение таблицы 6 на стр. 430–432

Таблица 6. (продолжение)

Ген	Продукт	Биохимические функции	Сигнальные пути, межклеточные взаимодействия. Эффекты генетической вариации на функции ЦНС (если описаны)
			<p>Локализуется в тормозных пресинаптических окончаниях, где модулирует ГАМК-трансмиссию. У мышей в эмбриогенезе регулирует миграцию 5-НТ нейронов из ядер шва в префронтальную кору, причем нокаут гена усиливает серотониновую иннервацию в префронтальной коре [11], что потенциально связывает роль гена с формированием избирательности эффектов серотонина в префронтальной коре.</p> <p>Т-кадгренин также специфически экспрессируется в клетках Гольджи в коре мозжечка, причем торможение его экспрессии в мозжечке не оказывает влияние на двигательные, но нарушает когнитивные функции и усиливает частоту социальных взаимодействий, но при этом приводит к потере избирательности последних [11].</p> <p>Ген Т-кадегрина содержит ГК-чувствительный элемент, тормозящий его экспрессию.</p>
<i>CYP11B1</i>	11 β -гидроксилаза	Добавляет ОН-группу к 11-деоксикортизолу и 11-деоксикортикостерону, превращая их в кортизол и кортикостерон	<p>Катализирует заключительную реакцию биосинтеза глюкокортикоидов, ключевых регуляторов нейропластичности гиппокампа [13].</p> <p>Генетическая вариация ассоциирована с чертами аутистического спектра и синдромом Аспергера [12].</p>
<i>11β-HSD</i>	11 β -гидроксистероид-дегидрогеназа, тип 1	Локально восстанавливает кортизол из кортикостерона	<p>Восстанавливая кортизол из кортикостерона, амплифицирует локальное действие глюкокортикоидов у большинства млекопитающих, для которых кортизол служит основным глюкокортикоидным гормоном [14].</p> <p>В мозге экспрессируется нейронами и микроглией, участвуя в регуляции стрессорного ответа и нейровоспалительных реакций.</p> <p>Поскольку фермент помогает ускорить действие глюкокортикоидов, он может способствовать как более эффективному завершению нейровоспалительной реакции под действием глюкокортикоидов, так и повреждающему действию этих гормонов при продолжительной экспозиции к ним. Опосредует дифференциальную регуляцию запоминания в зависимости от стрессора. Активность фермента усиливает эпилептогенер [15].</p>

Таблица 6. (продолжение)

Ген	Продукт	Биохимические функции	Сигнальные пути, межклеточные взаимодействия. Эффекты генетической вариации на функции ЦНС (если описаны)
<i>DGKH</i>	диацилглицерол киназа эта	Фосфорилирует диацилглицерол (DAG) с образованием фосфатидной кислоты	Регулятор внутриклеточных Са-ассоциированных сигнальных путей. Прекращает передачу сигнала DAG, которые вместе с инозитолтрифосфатом (IP3) диацилглицериды образуются из фосфолипидов мембран в результате активности фосфолипазы С. IP3 диффундирует вглубь клетки, где вызывает высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулина, DAG остается связанным с мембраной вследствие гидрофобности, но также потенцирует кальций-зависимые процессы, облегчая активацию протеинкиназы. С путем смещения фермента с мембраны в цитоплазму. <i>DGKH</i> переносит остаток фосфорной кислоты на свободный атом углерода глицерина, образуя фосфатидные кислоты, которые также участвуют в регуляции Са-зависимых процессов, в частности, облегчая образование везикул за счет изменения её свойств мембраны. В отсутствии фосфорилирования диацилглицериды гидролизуются с образованием жирных кислот, в частности, арахидоновой, являющейся предшественником анандамида и других эндоканнабиноидов. Регулирует LTP и LTD. Генетическая вариация имеет выраженную связь с риском возникновения биполярного расстройства личности [16].
<i>P2RX7</i>	Пуринорецептор 7	Лиганд-зависимый ионный канал	<i>P2X7R</i> экспрессируется глутаматергическими пирамидными нейронами гиппокампа и ненейрональными клетками: в астроцитах, олигодендроцитах и микроглией [17]. Открывает ворота в цитоплазму для двухвалентных катионов при связывании пуринов. Распознает внеклеточный АТФ-зависимый апоптоз. Регулятор внутриклеточных Са-ассоциированных сигнальных путей. Регулятор нейровоспаления. Активирует клетки миелоидного ряда, индуцирует экспрессию Интерлейкина-1-beta, вызывает дегрануляцию тучных клеток и активацию микроглии. Регулятор нейровоспаления. Долгосрочно усиливает LTP [18].
<i>CNR1</i>	Рецептор эндоканнабиноидов 1-го типа	Сопряженный с G-белками рецептор эндоканнабиноидной системы	Центральный элемент эндоканнабиноидной системы. Уровень эндоканнабиноидов увеличивается под действием ГК, а сами эндоканнабиноиды ограничивают развитие с рессорного ответа, в том числе, нейровоспаления. Опосредует эффекты глюкокортикоидов на консолидацию авersive воспоминаний [19].

Таблица 6. (окончание)

<i>FAAH</i>	Амидгидролаза жирных кислот	Интегральный мембранный фермент, гидролизует эндоканнабиноиды и родственные сигнальные липиды	Основной катаболический фермент амидов жирных кислот, в частности анандамида и других эндоканнабиноидов. Высоко-экспедирован в лимбической системе. Тормозит активность эндоканнабиноидов. Дексаметазон регулирует метаболизм эндоканнабиноидов путем ингибирования активности <i>FAAH</i> [19].
<i>GABRA2</i>	альфа-субъединица рецептора ГАМК-А	Лиганд-управляемый Cl ⁻ -канал, рецептор ГАМК (субъединица)	Как и эндоканнабиноиды, выступает в роли элемента защиты от повреждающего воздействия собственных реакций, вызванных социальным стрессом. Активация рецептора снижет тревожность, тормозит нейровоспалительные реакции. Вариация связана с тревожными расстройствами, синдромом Аспергнера, биполярным и шизоаффективным расстройством [20].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Были определены гены, потенциально вовлеченные в эволюцию поведения при доместикации, а также области мозга, в которых наблюдается синхронная экспрессия соответствующих им транскриптов. Наибольший интерес представляет совместная функциональная активность этих генов, которая способствовала межвидовой поведенческой адаптации. Ген *KITLG* и все 8 ассоциированных с ним генов обнаружили связь с процессами нейропластичности — что закономерно, поскольку любой ген, экспрессируемый в нервной системе, так или иначе задействован в нейропластичности — то есть в адаптации к внешней и внутренней среде на уровне нервной ткани. Связь отмеченных генов с нейропластичностью была выраженной и отмечалась в других работах как их ключевая характеристика. Функции этих генов, критичные для реализации нейропластичности, позволяют классифицировать их в три категории процессов по отношению к ней:

- 1. Инициация и реализация: *KITLG*, *CDH13*, *P2RX7*, *DGKH*.
- 2. Глюкокортикоид-зависимая регуляция: *HSD11B1*, *CYP11A1*.
- 3. Контроль и торможение: *CNR1*, *FAAH*, *GABRA2*.

Связь между *KITLG* и *HSD11B1* была наиболее выраженной среди всех комбинаций генов как на уровне геномной ковариации, так и в виде комплексного профиля экспрессии в мозге человека. *KITLG* может опосредовать влияние ГК на процессы нейропластичности, поскольку содержит глюкокортикоид-чувствительный элемент (GRE).

Связывание GRE с ядерным рецептором ГК вызывает торможение экспрессии *KITLG* [21]. Исходя из этого можно было бы предположить, что мутация в *KITLG* затронула сайт GRE, ослабляя контроль экспрессии *KITLG* и облегчая тем самым реализацию процессы нейропластичности. Однако, в лимбической системе человека *KITLG* и *11HSD1* экспрессировались синхронно (табл. 4). Это предполагает одинаковую направленность их эффектов. Экспериментальные данные позволяют идентифицировать такой механизм в гиппокампе, где глюкокортикоиды являются центральными регуляторами нейропластичности [22]. В промоторе *KITLG* также расположен сайт связывания NfKB. Одновременное связывание NfKB и *GRE* вызывает транзиторное усиление экспрессии *KITLG*, предшествуя торможению [21]. Активацию NfKB цитокинами традиционно связывают с воспалением. Однако, в гиппокампе интерлейкин 1β (IL1β) секретируется нейронами конститутивно [23]. В дорсальном гиппокампе острый стресс вызывает быстрое высвобождение IL1β которое опосредовано P2RX7 [24]. Интересно, что функции *KITLG* в эмбриогенезе, при имплантации бластоцисты в эндометрий, также связывают точечную перестройку внеклеточного матрикса с экспрессией IL1β [21].

Общим для изученных 8 генов и *KITLG* сигнальным путем является сигнальный путь фосфатидил-инозитола, активируемый *KITLG*. Наличие глюкокортикоид-чувствительных элементов в промоторных зонах *KITLG* и *CDH13*, совместно регулирующих фокальную адгезию и хемотаксис, а также связи этих генов с ферментами, усиливающими внутриклеточный сигнал глюкокортикоидов (*CYP11A1*, *HSD11B1*), свидетельствуют о том, что ГК выступают в роли регуляторов

нейропластичности, опосредованной *KITLG* и связанной, вероятно, с реорганизацией нейронных сетей.

Таким образом, данные настоящей работы свидетельствуют о глубокой роли глюкокортикоидов и *KITLG* в одомашнивании, позволяя предположить, что мутация в гене *KITLG* привела к изменению глюкокортикоидного контроля над процессами нейропластичности в областях мозга, связанных с социальным взаимодействием, тем самым повысив его эффективность. Пятнистость, также возникшая в результате мутации *KITLG*, могла стать катализатором domestikации, поскольку позволила особям разных видов легко различать друг друга и, таким образом, взаимодействовать долговременно и избирательно.

Обнаруженная связь между *KITLG*-геном, исходно связываемым с пигментацией, и генами, регулирующими нейропластичность, свидетельствуют о том, что геном domestikцированных животных может быть в большей степени специализирован на регуляцию поведенческих процессов, чем было показано ранее. В действительности, даже минимальная связь гена с поведением могла определять его дальнейший отбор в том случае, если полиморфизм гена также имел фенотипическое проявление, улавливаемое человеком. Таким образом, в процессе domestikации связь многих генов с поведением могла усилиться в результате отбора новых и ранее имевшихся аллелей, будучи у других видов менее значительна и, возможно, не описана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные связи предполагают, что *KITLG* является плагиотропным геном, связывающим окрас животных и нейрорхимическую регуляцию нейропластичности глюкокортикоидными гормонами в лимбической системе, в частности, в областях мозга, задействованных в регуляции социального поведения. Таким образом, может быть предложен новый механизм domestikации, а также раскрыты новые связанные с ним особенности функционирования нервной системы животных и человека. Полученные данные также свидетельствуют о том, что геном domestikцированных животных может быть в большей степени специализирован в связи с социально-ориентированным поведением, чем предполагалось ранее.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-76-10053).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Информированное согласие. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Talenti A., Bertolini F., Williams J., Moeen-Ud-Din M., Frattini S., Coizet B., Pagnacco G., Reecy J., Rothschild M.F., Crepaldi P., Italian Goat Consortium. // J. Hered. 2018. V. 109. № 3. P. 315–319.
2. Stella A., Nicolazzi E.L., Van Tassell C.P., Rothschild M.F., Colli L., Rosen B.D., Sonstegard T.S., Crepaldi P., Tosser-Klopp G., Joost S., the AdaptMap Consortium. // Genet. Sel. Evol. 2018. V. 50. 61.
3. Mukhina V., Svishcheva G., Voronkova V., Stolpovsky Y., Piskunov A. // Animals (Basel). 2022. V. 12. № 3. P. 221.
4. Shen E.H., Overly C.C., Jones A.R. // Trends neurosci. 2012. V. 35. № 12. P. 711–714.
5. Hirata T., Morii E., Morimoto M., Kasugai T., Tsujimura T., Hirota S., Kanakura Y., Nomura S., Kitamura Y. // Development (Cambridge, England). 1993. V. 19. № 1. P. 49–56.
6. Zhang S.C., Fedorof S. // J. Neurosci. Res. 1997. V. 47. № 1. P. 1–15.
7. Jin K., Ma X.O., Sun Y., Xie L., Greenberg D.A. // J. Clin. Investigation. 2002. V. 110. № 3. P. 311–319.
8. Lennartsson J., Rönnstrand L. // Physiol. Rev. 2012. V. 92 № 4 P. 1619–1649.
9. Yang Z., Shi H., Ma P., Zhao S., Kong Q., Bian T., Gong C., Zhao Q., Liu Y., Qi X., Zhang X., Han Y., Liu J., Li Q., Chen H., Su B. // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 9. P. 2272–2283.
10. Guijarro P., Wang Y., Ying Y., Yao Y., Jieyi X., Yuan X. // Dev. Neurobiol. 2013. V. 73. № 12. P. 871–887.
11. Tantra M., Guo L., Kim J., Zainolabidin N., Eulenburg V., Augustine G.J., Chen A.I. // Genes brain behav. 2018. V. 17. № 6. P. e12466.
12. Kuwahara N., Nicholson K., Isaacs L., MacLusky N.J. // Androg. Clin. Res. Ther. 2021. V. 2. № 1. P. 216–230.
13. Gulyaeva N.V. // Biochem. Moscow. 2023. V. 88. P. 565–589.
14. Olusola A., Ajilore, Robert M. Sapolsky. // Neuroendocrinology. 1999. V. 69. № 2. P. 138–144
15. Li X., Qiu W., Deng L., Lin J., Huang W., Xu Y., Zhang M., Jones N.C., Lin R., Xu H., Lin L., Li P., Wang X. // J. Transl. Med. 2022. V. 20. № 1. P. 406.

16. Lee D., Kim E., Tanaka-Yamamoto K. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2016. V. 4. P. 92.
17. Zhao Y.F., Tang Y., Illes P. // *Front. Mol. Neurosci.* 2021. V. 14. P. 641570.
18. Kesavan J., Watters O., de Diego-Garcia L., Méndez A.M., Alves M., Dinkel K., Hamacher M., Prehn J.H.M., Henshall D.C., Engel T. Purinergic signalling. 2023. 10.1007/s11302-023-09957-8. Advance online publication.
19. Granja-Galeano G., Dominguez-Rubio A.P., Zappia C.D., Wolfson M., Sanz-Blasco S., Aisemberg J., Zorrilla-Zubilete M., Fernandez N., Franchi A., Fitzsimons C.P., Monczor F. // *Neuropharmacology*. 2023. V. 239. P. 109674.
20. Melroy W.E., Stephens S.H., Sakai J.T., Kamens H.M., McQueen M.B., Corley R.P., Stallings M.C., Hopfer C.J., Krauter K.S., Brown S.A., Hewitt J.K., Ehringer M.A. // *Behav. Genet.* 2014. V. 44. № 4. P. 356–367.
21. Da Silva C.A., Heilbock C., Kassel O., Frossard N. // *FASEB J.* 2003. V. 17. № 15. P. 2334–2336.
22. Gulyaeva N. // *Neurochem. Res.* 2019. V. 44. P. 1306–1322.
23. Dutta S.S., Andonova A.A., Wöellert T., Hewett S.J., Hewett J.A. // *Neurobiol. Dis.* 2022. V. 168. P. 105689.
24. Peña-Altamira L.E., Polazzi, E., Giuliani P., Beraudi A., Massenzio F., Mengoni I., Poli A., Zuccarini M., Ciccarelli R., Di Iorio P., Virgili M., Monti B., & Caciagli F. // *Neurochem. Int.* 2018. V. 115. P. 37–49.

Selection Signal in C-Kit Ligand Gene Linked to Glucocorticoid-Regulated Neuroplasticity: a New Angle on Domestication Mechanisms

A. K. Piskunov¹, V. N. Voronkova¹, E. A. Soloshenkova¹, N. Yu. Saushkin^{1, 2},
J. V. Samsonova^{1, 2}, and Yu. A. Stolpovsky¹

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Domestication profoundly shapes the evolutionary trajectories of both humans and animals. Despite significant scientific interest, the genetic underpinnings of domestication, particularly those related to behavior, remain elusive. This paradox may be reconciled by considering that behavior-associated genes have already been identified but categorized exclusively to other functional groups. Our investigation into this hypothesis utilized goat genome and human brain transcriptome data, focusing on the pigmentation gene *KITLG* due to its frequent association with domestication. Through analysis of interpopulation covariation between *KITLG* and candidate genes in the domestic goat genome (*Capra hircus*), we identified eight genes evolutionarily linked with *KITLG*. These genes were divided into three functional categories: (i) regulation of the glucocorticoid (GC) signal, (ii) initiation, and (iii) control of structural neuroplasticity. In the human brain, the regional expression patterns of the corresponding transcripts were complementary and most pronounced in areas associated with social interaction. We propose that a mutation in *KITLG* may decrease the activation threshold for GC-mediated neuroplasticity in these regions, enhancing the processing of social stimuli. The association of this allele with spotted coat patterns likely facilitated its selection, with the uniqueness of the pattern promoting selective social contacts. Consequently, the genomes of domesticated animals is probably more profoundly influenced by behavioral functions than previously believed. Further research could unveil novel functional attributes of the nervous systems in both animals and humans.

Keywords: glucocorticoid, neuroplasticity, domestication, limbic system, KITLG, SCF, goat, brain

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА РАЗНЫХ СРОКАХ ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

© 2024 г. М. Ю. Жанина^{1, 2}, Т. А. Дружкова^{1, *}, А. А. Яковлев^{1, 2}, А. Б. Гехт^{1, 3}, Н. В. Гуляева^{1, 2}

¹Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

*E-mail: druzhkova.tatiana@mail.ru

Поступила в редакцию 03.12.2023 г.

После доработки 10.12.2023 г.

Принята к публикации 11.12.2023 г.

Несмотря на то, что ишемический инсульт (ИИ) является одной из основных причин долгосрочной инвалидности во всем мире, до сих пор нет однозначного понимания причин разной степени и скорости выздоровления пациентов после ИИ. В основе постинсультного восстановления лежит высокоорганизованное взаимодействие структур и клеток мозга с другими органами и тканями, которое включает в себя ряд патофизиологических процессов, происходящих как в самом мозге, так и за его пределами. Экзосомы участвуют в модуляции постинсультных патофизиологических процессов, опосредуя коммуникацию между клетками и тканями, в первую очередь, путем доставки таких молекул, как белки и мкРНК. В работе был проведен сравнительный количественный анализ белковых профилей экзосом сыворотки крови пациентов, обследованных на разных сроках после ИИ. Уровень белков, связанных с функционированием иммунной системы и свертываемостью крови, в экзосомах сыворотки крови пациентов, обследованных через 1.5–2 года после ИИ, была достоверно выше по сравнению с показателями пациентов, обследованных в более ранний постинсультный период. Полученные результаты могут свидетельствовать о повышенном уровне активности иммунной системы на отдаленных сроках после ИИ по сравнению с ранним постинсультным периодом и об участии экзосом в этом феномене. Дальнейшее исследование молекулярно-биохимических параметров экзосом на отдаленных сроках после инсульта позволит более полно оценить риски неблагоприятных исходов ИИ, связанных с иммуновоспалением, и найти потенциальные мишени для их снижения.

Ключевые слова: экзосомы, сыворотка крови, ишемический инсульт, масс-спектрометрия, протеомный анализ

DOI: 10.31857/S1027813324040148, EDN: EFZUBM

Список сокращений:

ИИ – ишемический инсульт
КТ – компьютерная томография
МРТ – магнитная резонансная томография
NIHSS – шкала Национального института здравоохранения США (The National Institutes of Health Stroke Scale)
MoCA – монреальская когнитивная шкала (Montreal Cognitive Assessment)
HADS – госпитальная шкала тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and depression Scale)
TMT – тандемная массовая метка (tandem mass tag)

PSM – соответствие пептидного спектра (peptide-spectrum match)

FDR – частота ложного обнаружения (False Discovery Rate)

ЛП – липопротеины

Апо- – аполипротеин

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

ВВЕДЕНИЕ

Ишемический инсульт (ИИ), нарушение мозгового кровообращения с повреждением ткани мозга

и изменением его функций, чаще всего бывает обусловлен стенозом внутричерепной артерии и окклюзией средней мозговой артерии [1]. Патологическое повреждение ишемизированных тканей, кровеносных сосудов и нервной системы зависит от длительности сосудистой эмболии и часто приводит к необратимым последствиям. Восстановление после ИИ включает в себя ряд патофизиологических процессов, происходящих как в самом мозге, так и за его пределами [2, 3]. Первые сутки после ИИ обозначают как сверхострую фазу, первые семь суток как острую фазу, первые 3–6 месяцев как подострую фазу, а начиная с 6 месяцев как хроническую фазу [4]. Обоснование этой классификации заключается в том, что процессы, связанные с восстановлением после инсульта, зависят от времени. Было показано, что уже в первые сутки после ИИ запускается каскад механизмов, связанных с воспалением в области ишемического очага с активацией резидентной глии, массивной секрецией медиаторов воспаления и инфильтрацией периферических иммунных клеток через нарушенный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [5]. По данным литературы, наиболее значительные улучшения после ИИ происходят в первый месяц после инсульта, часто достигая относительного плато через 3 месяца, особенно в отношении двигательных симптомов [6]. Через 6–12 месяцев выздоровление обычно достигает своего предела, приводя к более или менее стабильному, хроническому состоянию с разной степенью выраженности функционального восстановления. Несмотря на существующее мнение о том, что восстановление после ИИ следует определенным закономерностям, нет однозначного понимания причин разной индивидуальной степени и скорости выздоровления пациентов после инсульта. Комплексная оценка патогенеза ИИ на разных его стадиях имеет основополагающее значение для разработки подходов к персонализированному лечению пациентов, перенесших инсульт.

Как кратковременные, так и отсроченные процессы восстановления после ИИ обусловлены высокоорганизованным взаимодействием структур и клеток мозга с другими органами и тканями. От полноценности и направленности этих взаимодействий во многом зависят скорость и степень восстановления пациентов после ИИ. Многочисленные исследования показали, что экзосомы участвуют в модуляции патофизиологических процессов после ИИ, опосредуя коммуникацию между клетками и тканями, в первую очередь, путем доставки таких молекул, как белки и микроРНК [7, 8].

Экзосомы представляют собой подмножество внеклеточных везикул диаметром от 30 до 150 нм, которые высвобождаются из мультивезикулярных тел, липидной двухслойной мембранной структуры и несут функциональное содержимое, включающее

нуклеиновые кислоты, белки, липиды и метаболиты [9, 10]. После инсульта экзосомы могут синтезироваться и высвобождаться клетками головного мозга, пересекать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и обнаруживаться в периферической крови или спинномозговой жидкости, а также высвобождаться в кровоток из клеток крови в ответ на инсульт [11]. Показано, что высвобождение экзосом из разных типов поврежденных клеток мозга в периферическое кровообращение после инсульта запускает продукцию циркулирующих воспалительных цитокинов и модулирует периферические иммунновоспалительные реакции путем рекрутирования и активации Т- и В-лимфоцитов [12]. Получены данные о том, что экзосомы участвуют в повышении долгосрочной нейропротекции после инсульта, способствуют регенерации нервов, ускоряют неврологическое восстановление и регулируют периферические иммунные реакции. Есть данные об их участии в модуляции процессов ангиогенеза, нейрогенеза и ремоделирования аксональных дендритов [13]. Уникальные способности экзосом целенаправленно переносить информационные биомолекулы через ГЭБ в обоих направлениях, модулируя биологические процессы и сохраняя переносимый “груз” от разрушения в биологических жидкостях организма, делают их перспективным объектом для исследования многих патологий мозга, включая ИИ. Показано, что экзосомы являются перспективными кандидатами на роль биомаркеров для ранней диагностики и прогнозирования инсульта, а также для разработки способов его лечения [11].

Белковый состав внеклеточных везикул на данный момент хорошо изучен, сведения о нем собраны в базе данных Vesiclepedia (<http://microvesicles.org>) и постоянно пополняются. Кроме того, данные о составе экзосом, включая РНК и липиды, содержатся в базе ExoCarta (<http://www.exocarta.org>). Сравнительный анализ белкового состава экзосом сыворотки крови пациентов, обследованных на разных сроках после ИИ, направлен на поиск потенциальных мишеней для оценки состояния пациентов с целью снижения рисков развития неблагоприятных исходов. В настоящее время методы протеомного анализа позволяют количественно оценить белковые профили различных биологических жидкостей, клеток и их производных практически при любой патологии.

Цель исследования: в работе был проведен сравнительный количественный анализ белковых профилей экзосом сыворотки крови пациентов, обследованных на разных сроках после ИИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследовании приняли участие 30 человек, проходившие лечение в ГБУЗ им. Кончаловского в 2021–2023 гг. Пациенты были

отобраны в исследование согласно следующим критериям: возраст 45–80 лет; ишемический инфаркт головного мозга полушарной локализации; легкая и средняя тяжесть ИИ; поступление в стационар не позже 48 часов после ИИ. Критериями исключения были: наличие инсульта, черепно-мозговой травмы в анамнезе с остаточными очаговыми изменениями на КТ/МРТ; наличие когнитивных и депрессивных нарушений в анамнезе; острые и хронические соматические и гормональные заболевания; алкогольная или наркотическая зависимость. Было обследовано: 9 человек в первые сутки после ИИ, 5 человек через 1 месяц после ИИ, 5 человек через 1 год после ИИ и 11 человек через 1.5–2 года после ИИ.

Социально-демографические сведения, анамнез заболевания и жизни были собраны у пациентов после ИИ в период первичной госпитализации. Оценка неврологических, психиатрических и когнитивных показателей состояния испытуемых проводилась с использованием следующих психометрических инструментов: NIHSS [14]; MoCA [15]; HADS [16]. Информированное согласие на участие в исследовании было подписано каждым включенным в исследование испытуемым.

Подготовка образцов для исследования. Забор крови у пациентов на всех сроках обследования проводился из локтевой вены в утренние часы натощак в вакуумные системы с активатором свертывания для получения сыворотки крови с последующим центрифугированием при 2000 g 15 мин при 4°C.

Оценка концентрации экзосом в сыворотке крови в каждой пробе была выполнена методом иммуноферментного анализа наборами ELISA EXO-TEST (HansaBioMed) в соответствии с инструкцией производителя.

Для получения экзосом из сыворотки крови пациентов были использованы наборы для выделения экзосом Exo-prep (HansaBioMed). Далее для удаления загрязняющих компонентов проводили экстракцию белка в системе хлороформ-метанол по следующему протоколу. К исходным образцам в объеме 100 мкл добавляли 400 мкл метанола 99.8%, перемешивали 30 с. Добавляли 100 мкл хлороформа 99.5%, перемешали 30 с. Добавляли 300 мкл воды, перемешали 30 сек. Смесь центрифугировали в течение 2 мин при 14000 g. Удаляли надосадочную жидкость и к нижней фракции добавляли 400 мкл метанола, перемешивали 30 с, центрифугировали в течение 5 мин при 13000 g, удаляли супернатант. Осадок высушивали при комнатной температуре.

Полученный осадок экзосом крови пациентов и растворенный по инструкции производителя стандарт экзосом HBM-PES-100 (HansaBioMed) лизировали в кратном объеме буфера, содержащего

10% SDS в 50 мМ триэтиламмония бикарбонате (ТЕАБ). Далее был проведен гидролиз белков трипсином с использованием фильтров S-Trap. На гидролиз белков трипсином брали по 50 мкг белка для образцов экзосом, выделенных из крови пациентов и все доступное количество (93 мкг) для образца-стандарта экзосом.

После гидролиза белков в супернатантах проб определяли общую концентрацию пептидов методом колориметрического анализа с использованием набора Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Пептиды высушивали и растворяли в 0.1% муравьиной кислоте до конечной концентрации 0.3 мкг/мкл.

Хромато-масс-спектрометрия образцов и идентификация белков. Полученные пептиды разделяли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США).

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX (“Thermo Scientific”, США), как описано ранее [17]. Идентификацию белков проводили при помощи программного обеспечения MaxQuant v. 2.0.3.0 с использованием поискового алгоритма Andromeda [18]. Для идентификации белков использовали базу данных протеома человека в UniProt (UP000005640). Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков устанавливали пороговую величину FDR (False Discovery Rate) 0.01. Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено, по крайней мере, два пептида.

Мечение пептидов проводили с использованием 10-плексного набора меток TMT. Перед хромато-масс-спектрометрией образцов с использованием TMT и идентификацией белков было проведено обессоливание образцов. Меченые TMT пептиды разделяли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (“ThermoScientific”, США).

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX (“Thermo Scientific”, США), как описано ранее [17].

Идентификацию белков проводили при помощи программного обеспечения MaxQuant v.2.0.3.0 с использованием поискового алгоритма Andromeda [18]. Включали опцию “Matchbetweenrun” и выбирали тип нормализации “weighted ratio to reference channel”, определяя вес в соответствии с рекомендациями из публикации [19]. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM, идентификации пептидов и идентификации белков

использовали величину FDR не более 1.0%. Для сравнительного количественного анализа при помощи TMT проводилась дополнительная нормализация. Для этого рассчитывался суммарный сигнал для всех белков в каждом TMT-канале.

Дальнейший анализ данных, полученных в ходе идентификации и дополнительной нормализации, проводили в программе Perseus.2.0.11. Для количественной оценки содержания белков в программу загружали величины нормализованной интенсивности "NormRIC". Данные фильтровали, удаляя белки-контаминанты, ложно-положительные идентификации, оставляя в анализе белки, которые были идентифицированы по 2 и более пептидам. Группы белков, не имеющие 85% достоверных значений нормализованной интенсивности "NormRIC", хотя бы в одной экспериментальной группе, были удалены.

Хромато-масс-спектрометрический анализ образцов, включая пробоподготовку, был проведен на базе ЦКП "Протеом человека" ИБМХ им. В.Н. Ореховича, г. Москва.

Статистический анализ. Статистическая обработка и визуализация данных были проведены в программах STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OKUSA) и GraphPad Prism version 9.4.1. software (GraphPad Software, Inc., SanDiego, CA, USA), а также в среде программирования R с использованием как встроенных пакетов, так и дополнительных (heatmap2, ggplot2 и др.). Нормальность распределения определяли при помощи теста Шапиро-Уилка. Для сравнения двух количественных несвязанных выборок с нормальным распределением данных был использован t-тест Стьюдента. Для поиска различий в частотах встречаемости различных признаков использовали точный тест Фишера. Результаты на графиках представлены как среднее и стандартная ошибка среднего. Корреляции рассчитывали при помощи теста Пирсона. При $p < 0.05$ различия считали достоверными; при $p < 0.1$ различия считали на уровне тенденции к достоверности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика пациентов, включенных в исследование. Были проанализированы показатели 30 пациентов: 9 человек через сутки после ИИ, 5 человек через месяц после ИИ, 5 человек через год после ИИ, 11 человек через 1.5–2 года после ИИ. Пациенты сравниваемых групп не отличались по возрасту, по соотношению мужчин и женщин в группах, по сопутствующим заболеваниям, по локализации и латерализации инсульта, по данным психометрическим шкалам, а также по показателям рутинных лабораторных исследований (табл. 1). Включенные в исследование пациенты перенесли ИИ легкой/умеренной степени

тяжести (средний балл по NIHSS при поступлении составлял 5.9 ± 4.3). Пациенты, обследованные на 1-е сутки после ИИ, закономерно имели более высокие показатели по шкале NIHSS по сравнению с данными пациентов, протестированных на более поздних сроках (через месяц, через год и через 1.5–2 года после ИИ).

У пациентов, обследованных через 1.5–2 года после ИИ, был выявлен достоверно повышенный уровень экзосом в сыворотке крови по сравнению с пациентами других групп на фоне сходного количества суммарного белка на частицу (экзосому) (табл. 1).

Протеомный анализ экзосом сыворотки крови пациентов после ИИ. В результате протеомного анализа экзосом сыворотки крови было определено 228 белков без учета белков-контаминантов. В качестве стандарта был использован коммерческий образец экзосом сыворотки крови человека HBM-PES-100 (HANSA BIOMED). Данный образец анализировали при помощи панорамной масс-спектрометрии для определения его белкового состава и сравнения с белками экзосом, выделенных из сыворотки крови пациентов в разное время после ИИ.

В результате хромато-масс-спектрометрического анализа в образце-стандарте было достоверно идентифицировано 200 белков без учета белков-контаминантов. Для сравнения белкового состава образца-стандарта экзосом и образцов экзосом, полученных из сыворотки крови пациентов, построили диаграммы Венна при помощи ресурса: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> (рис. 1). Для того, чтобы избежать разночтений при наличии синонимичных изоформ белков в образцах пациентов и в стандарте, диаграмму Венна строили на основе названия гена. При этом для стандарта количество уникальных записей для названий генов составляло 175, а для образцов от пациентов – 159. Более 75% белков ($n = 122$) из образцов сыворотки крови пациентов являлись общими с белками образца-стандарта HBM-PES-100. Полученные результаты свидетельствуют о приемлемом качестве выделения внеклеточных везикул (экзосом) из сыворотки крови пациентов в разные сроки после ИИ.

Для сравнительного анализа белков экзосом пациентов на разных сроках после ИИ отбирали белки с количественной оценкой на основе TMT, для которых было определено, по меньшей мере, 85% валидных значений хотя бы для одной из экспериментальных групп ($n = 162$). При сравнительной оценке белковых профилей экзосом сыворотки крови не было выявлено четкого разделения образцов по белковым профилям на разных сроках после ИИ. Тем не менее, были выявлены некоторые аполипопротеины и иммуноглобулины, уровень которых была различной

Таблица 1. Показатели групп пациентов на разных сроках после ИИ. Статистические различия количественных переменных между временными точками оценивались с помощью one-way ANOVA теста с последующим post-hoc анализом при помощи теста Тьюки. Статистические различия качественных переменных оценивались при помощи точного теста Фишера. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$

Показатель mean \pm SD	1сутки n = 9	1 месяц n = 5	1 год n = 5	1,5-2 года n = 11	p-value
Возраст, годы	54.4 \pm 13.2	55.8 \pm 12.05	57.2 \pm 5.1	59.5 \pm 6.6	0.72
Пол (муж/жен), n	5/4	3/2	3/2	9/2	0.63
Дислипидемия (да/нет), n	5/4	3/2	3/2	4/7	0.78
Курение (да/нет), n	4/5	3/2	1/4	6/5	0.67
Локализация (средняя/задняя, мозговая артерия), n	7/2	3/2	2/3	8/3	0.56
Латерализация (правосторонний/левосторонний), n	4/5	1/4	2/3	8/3	0.25
NIHSS, баллы	5.4 \pm 2.6	1.6 \pm 1.8	1.2 \pm 1.6	0.8 \pm 1.5	0.0001 1 сутки-1 месяц $p = 0.01^{**}$; 1 сутки-1 год $p = 0.003^{**}$; 1 сутки-2 года $p = 0.0001^{****}$
MoCA, баллы	26.4 \pm 2.6	26.8 \pm 2.1	27.2 \pm 1.3	24.3 \pm 3.5	0.14
HADS тревога, баллы	3.9 \pm 3.3	2.8 \pm 1.3	2.6 \pm 1.6	2.6 \pm 2.2	0.66
HADS депрессия, баллы	2.8 \pm 3.5	2 \pm 1.7	2.2 \pm 2.1	3.4 \pm 2.5	0.76
Глюкоза, ммоль/л	6.2 \pm 0.9	5.5 \pm 0.5	5.8 \pm 0.8	5.4 \pm 0.4	0.1
Холестерин, ммоль/л	5.3 \pm 1.4	4.8 \pm 1.6	5.0 \pm 0.8	4.4 \pm 0.9	0.37
Протромбиновый индекс, отн. ед.	101.4 \pm 8.1	100.8 \pm 5.6	110.4 \pm 9.0	103.7 \pm 3.7	0.33
Лейкоциты, 10^9 в мл	7.7 \pm 4.3	7.0 \pm 1.4	6.2 \pm 1.6	7.3 \pm 1.6	0.83
Лимфоциты, %	30.5 \pm 19.0	38.0 \pm 4.6	27.7 \pm 4.9	26.7 \pm 10.3	0.44
Нейтрофилы, %	53.1 \pm 26.5	49.2 \pm 5.6	60.1 \pm 9.5	62.6 \pm 12.6	0.46
Кол-во белка/частицу, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6.4 \pm 3.2	4.9 \pm 2.4	7.1 \pm 4.06	7.5 \pm 3.52	0.55
Количество экзосом/ $\text{мл} \cdot 10^9$	5.2 \pm 1.3	5.4 \pm 0.9	4.5 \pm 1.4	9.4 \pm 3.5	0.002 1 сутки-2 года $p = 0.01^{**}$; 1 месяц-2 года $p = 0.03^*$ 1 год-2 года $p = 0.01^*$

в экзосомальной фракции сыворотки крови пациентов на выбранных сроках после ИИ.

Аполипопротеины экзосомальной фракции сыворотки крови с различным уровнем на разных сроках после ИИ. Известно, что аполипопротеины

обеспечивают растворимость липидных комплексов и их транспорт, а также действуют как лиганды для рецепторов ЛП, регулируют образование ЛП, служат активаторами или ингибиторами ферментов, участвующих в метаболизме ЛП. При

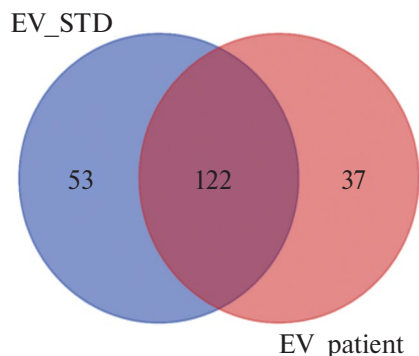


Рис. 1. Диаграмма Венна, демонстрирующая различие белкового состава образцов экзосом: стандарта HBM-PES-100 ($n = 175$), обозначенного как EV_STD, и образцов экзосом, выделенных из сыворотки крови пациентов EV_patient ($n = 159$).

сравнении белкового состава экзосом сыворотки крови пациентов на ранних и поздних сроках после ИИ были найдены достоверные различия по уровням аполипопротеинов: Апо-А1 (рис. 2а), Апо-Л1 (рис. 2б) и Апо-В (рис. 2в). Известно, что Апо-А1 играет важную роль в транспортировке избытка холестерина. Помимо атеропротекторного эффекта, Апо-А1 оказывает также противовоспалительное и антиоксидантное действие. Есть данные, что снижение уровня Апо-А1 в сыворотке крови увеличивает риск глубокого подкоркового инфаркта, который часто сопряжен с поражением белого вещества головного мозга [20]. Известно, что Апо-Л1 всегда ассоциирован с Апо-А1 и представлен не только в крови, но и в центральной нервной системе. Напротив, Апо-В, являющийся основным структурным белком ЛПНП и ЛПОНП

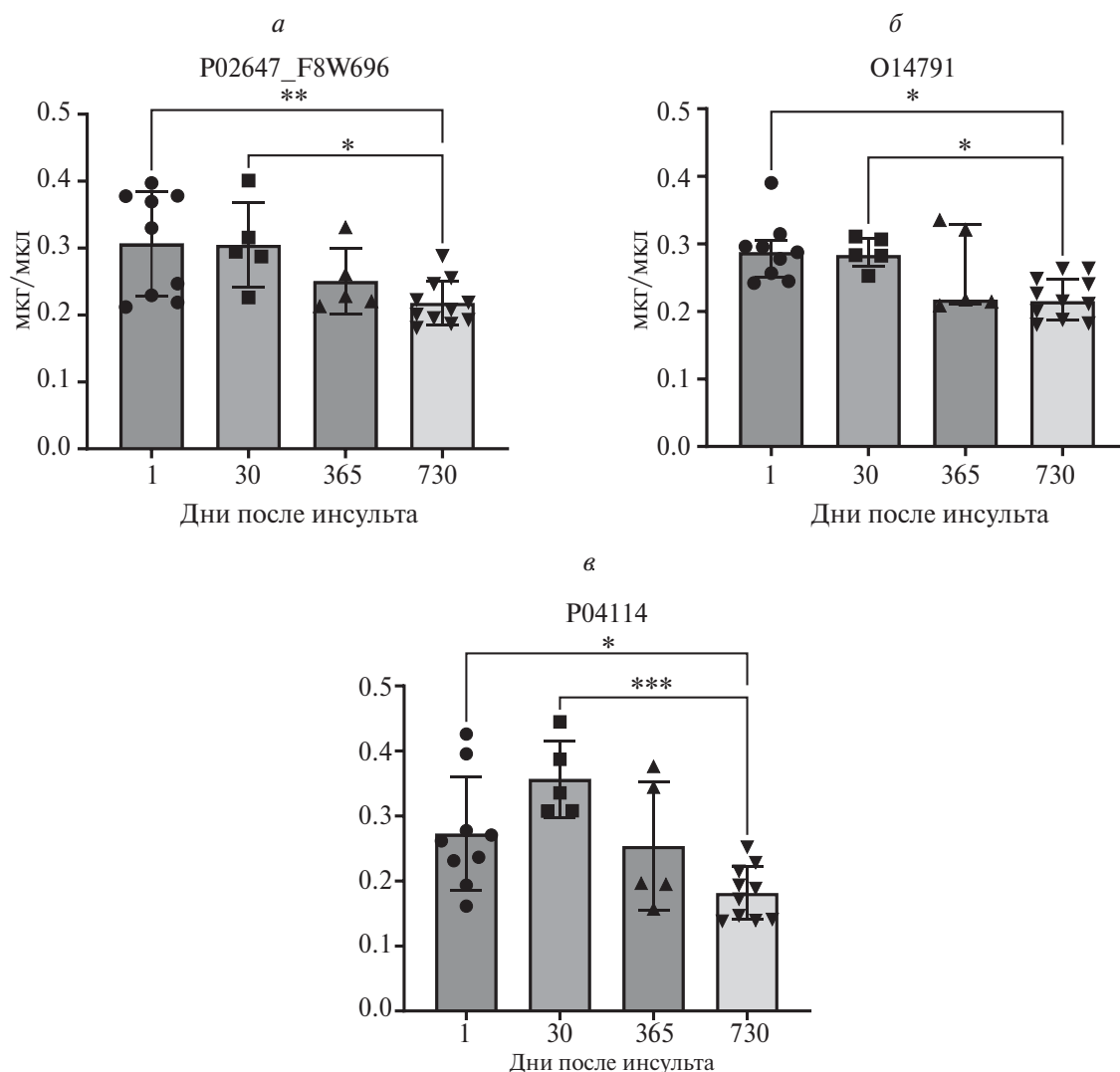


Рис. 2. Уровень аполипопротеинов: Апо-А1(а), Апо-Л1 (б), Апо-В (в) в экзосомах сыворотки крови пациентов на разных сроках после ИИ. Статистические различия между временными точками оценивались при помощи one-way ANOVA теста с post-hoc анализом при помощи теста Тьюки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

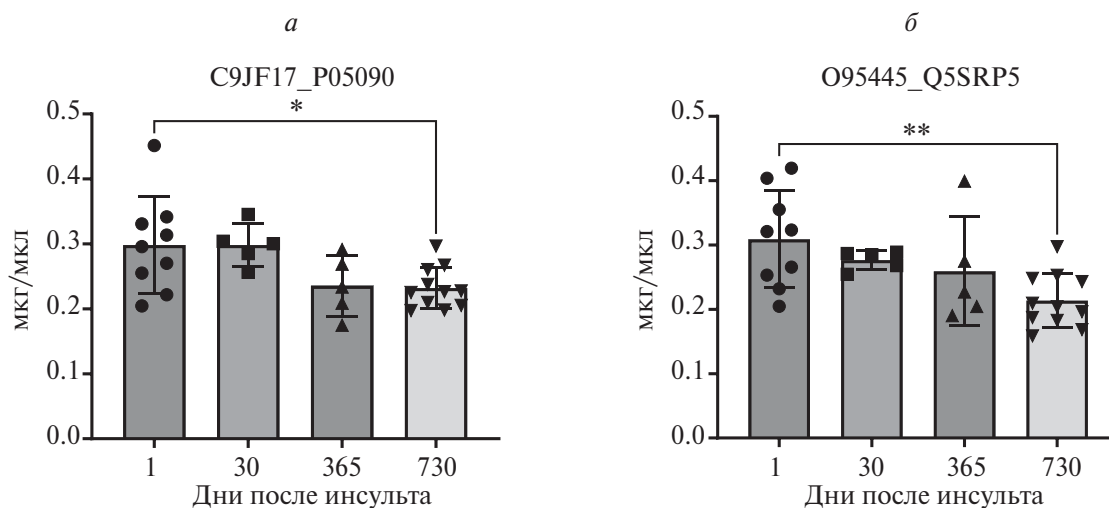


Рис. 3. Уровень аполипопротеинов: Апо-D(а), Апо-M(б), в экзосомах сыворотки крови пациентов на разных сроках после ИИ. Статистические различия между временными точками оценивались при помощи one-way ANOVA теста с post-hoc анализом при помощи теста Тьюки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

при окислении создает множество провоспалительных продуктов и способствует распространению атерогенеза в артериальной стенке [21].

Сравнительный анализ аполипопротеинов экзосомальной фракции сыворотки крови из семейства липокалинов Апо-Ди Апо-М, входящих в состав ЛПВП и обладающих способностью связывать и транспортировать малые липофильные белки, представлен на рис. 3а и рис. 3б. Достоверные различия по уровням этих белков были найдены при сравнении экзосомальных фракций пациентов, обследованных в первые сутки и в отдаленный период после ИИ. Известно, что указанные белки

связаны с нейропротекцией. Есть данные, что нейропротекторный и противовоспалительный эффект Апо-D может быть результатом его способности стабилизировать арахидоновую кислоту на клеточной мембране или изолировать ее, тем самым предотвращая ее трансформацию в провоспалительные молекулы. Известно, что у человека Апо-D концентрируется в цитозоле глиальных клеток белого вещества. В сером веществе Апо-D преимущественно локализован в протоплазматических астроцитах и в некоторых нейронах. Апо-D также обнаруживается в цитозоле периваскулярных

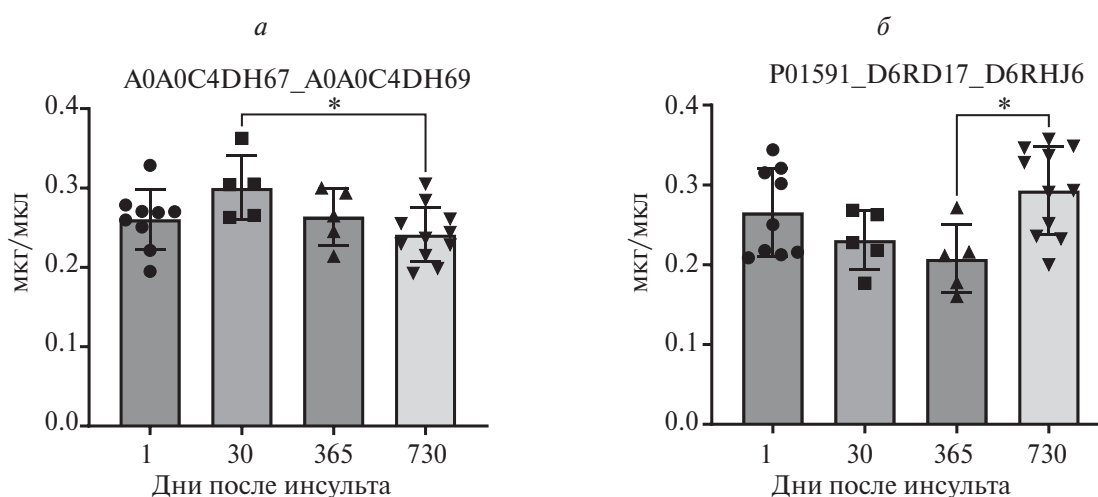


Рис. 4. Уровни иммуноглобулинов: Свободная каппа-цепь иммуноглобулина 1-8 (а) и Соединительная (J) цепь иммуноглобулина (б) в экзосомах сыворотки крови пациентов на разных сроках после ИИ. Статистические различия между временными точками оценивались при помощи one-way ANOVA теста с post-hoc анализом при помощи теста Тьюки. * $p < 0.05$.

клеток и в лизосомах перицитов стенок кровеносных сосудов неокортекса [22].

При сравнительном анализе белков экзосомальной фракции сыворотки крови групп пациентов, обследованных на разных сроках после ИИ, также были найдены различия в уровнях свободной каппа-цепи иммуноглобулина 1–8 и соединительной (J) цепи иммуноглобулина (рис. 4а, 4б). Известно, что оба иммуноглобулина задействованы в регуляции иммунного ответа, располагаются во внеклеточном пространстве и входят в состав циркулирующих иммуноглобулиновых комплексов.

Выявленные достоверные различия при попарном сравнительном анализе уровней белков экзосом сыворотки крови групп пациентов на разных сроках после ИИ. При сравнении белковых профилей экзосом сыворотки крови пациентов, обследованных в первые сутки после ИИ и через месяц после ИИ, не было выявлено существенных различий в экспрессии белков.

При сравнительной оценке белков экзосом сыворотки крови групп пациентов, обследованных через 1 месяц и через 1 год после ИИ, были найдены достоверные различия по экспрессии 13 белков. Среди них 50% составляли белки,

участвующие в процессе свертывания крови, около 30% – иммуноглобулины и приблизительно 20 % Апо- В и Апо- D (табл. 2).

Уровни практически всех белков, для которых были найдены достоверные различия между группами, была ниже у пациентов, обследованных через год после ИИ, по сравнению с показателями пациентов, обследованных через месяц после ИИ. Полученные данные не противоречат имеющейся информации о том, что через 6–12 месяцев после ИИ восстановительный процесс обычно достигает своего предела, приводя к более или менее стабильному, хроническому состоянию организма [23].

При попарном сравнении белковых профилей экзосом сыворотки крови групп пациентов через 1 месяц и 1.5–2 года после ИИ были найдены достоверные различия по уровням 31 белка. При этом уровни примерно 30% из них на поздних сроках после ИИ были повышены по сравнению с ранним постинсультным периодом. Примечательно, что все белки с выявленным повышенным уровнем через 1.5–2 года после ИИ имели отношение к активации/регуляции иммунной системы. Уровни остальных белков экзосомальной фракции сыворотки крови (примерно 20% белков, регулирующих липидный обмен, 50% белков, связанных со

Таблица 2. Уровни белков для которых были выявлены достоверные различия при попарном сравнительном анализе протеома экзосом сыворотки крови пациентов через 1 месяц и через 1 год после ИИ. Статистические различия между группами оценивались при помощи t-теста. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Название белка	Название гена	Уровень месяц→год	p-value
Свободная лямбда-цепь иммуноглобулина 3-10	IGLV3-10	↑	0.022
Тяжелая цепь иммуноглобулина 6-1	IGHV6-1	↓	0.010
Аполипопротеин D	APOD	↓	0.026
Церулоплазмин	CP	↓	0.007
Альфа-2-макроглобулин	A2M	↓	0.004
Кининоген-1	KNG1	↓	0.049
Свободная каппа-цепь иммуноглобулина 5-1	LOC644704	↓	0.045
Альфа-1-микроглобулин	AMBP	↓	0.027
Аполипопротеины В-100;В-48	APOB	↓	0.033
Кофактор гепарина 2	SERPIND1	↓	0.037
Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H2	ITIH2	↓	0.007
Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H1	ITIH1	↓	0.039
Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H4	ITIH4	↓	0.029

Таблица 3. Уровни белков для которых были выявлены достоверные различия при попарном сравнительном анализе протеома экзосом сыворотки крови пациентов через 1 месяц и через 1.5–2 года после ИИ. Статистические различия между группами оценивались при помощи t-теста. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Название белка	Название гена	Уровни 1 месяц→1.5–2 года	p-value
Лямбда-цепь иммуноглобулина 3-10	IGLV3-10	↑	0.000
Субкомпонент комплемента C1s	C1S	↑	0.000
Субкомпонент комплемента C1r	C1R	↑	0.000
Соединительная (J) цепь иммуноглобулина	IGJ;JCHAIN	↑	0.001
Субъединица субкомпонента C комплемента C1q	C1QC	↑	0.001
Компонент комплемента c7	C7	↑	0.003
Свободная каппа-цепь иммуноглобулина 1-6	IGKV1-6	↑	0.002
Тяжелая цепь иммуноглобулина 3/OR16-12	IGHV3OR16-12	↑	0.001
Субъединица субкомпонента B комплемента C1q	C1QB	↑	0.002
Лямбда-цепь иммуноглобулина 5-1 HA; VOR	GLV	↑	0.002
Пренилцистеин оксидаза 1	PCYOX1	↓	0.002
Кофактор гепарина 2	SERPIND1	↓	0.002
Калликреин плазмы	KLKB1	↓	0.002
Каллистатин	SERPINA4	↓	0.002
Антитромбин-III	SERPINC1	↓	0.001
Ретинол-связывающий белок 4	RBP4	↓	0.002
Бета-2-гликопротеин 1	APOH	↓	0.001
Белок, родственник гаптоглобину	HPR	↓	0.002
Аполипопротеин А-I	APOA1	↓	0.001
Аполипопротеин С-IV	APOC4	↓	0.001
Фиколин-3	FCN3	↓	0.001
Транстиретин	TTR	↓	0.001
Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H4	ITIH4	↓	0.000
Кининоген-1	KNG1	↓	0.000
Аполипопротеин А	LPA	↓	0.000
Протромбин	F2	↓	0.000
Альфа-2-макроглобулин	A2M	↓	0.000
Аполипопротеин Е	APOE	↓	0.000
Аполипопротеин L1	APOL1	↓	0.000
Аполипопротеин В-100; В-48	APOB	↓	0.000

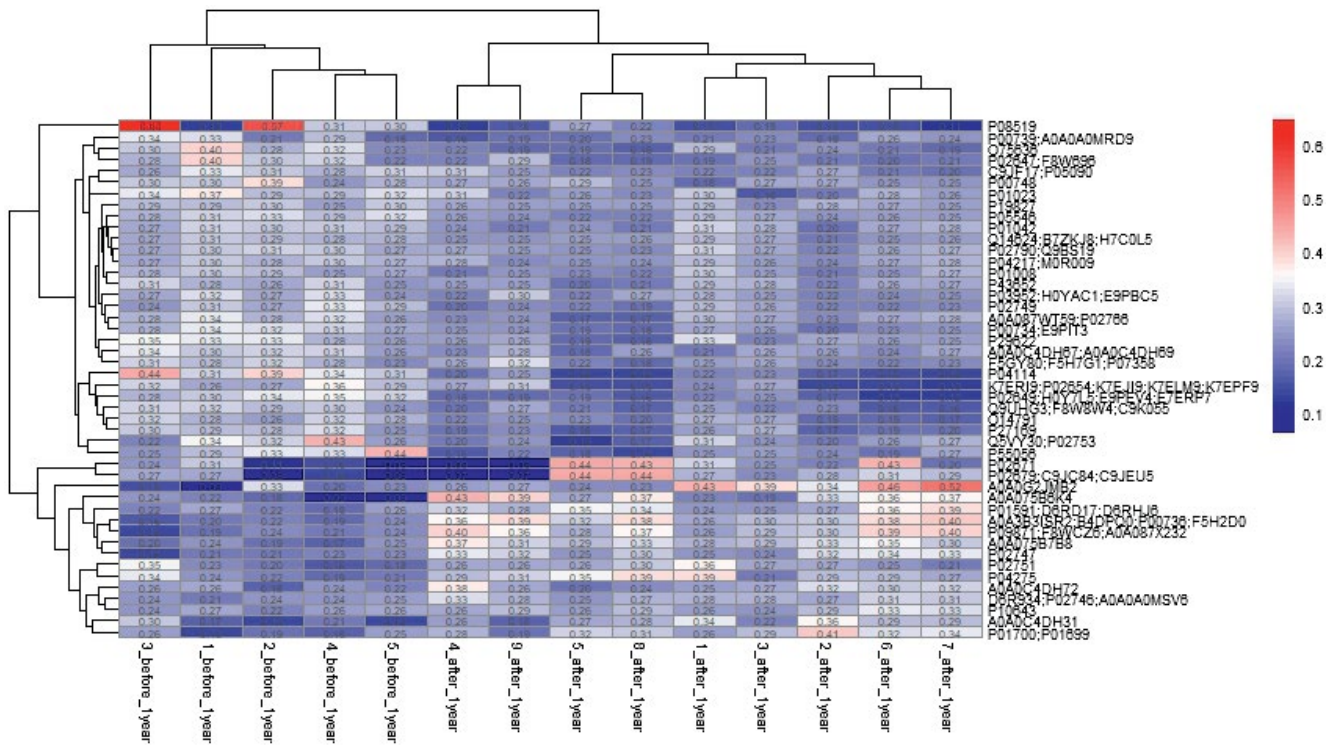
свертываемостью крови и гомеостазом) была понижена у пациентов через 1.5–2 года после ИИ по сравнению с пациентами, обследованными через 1 месяц после ИИ (табл. 3). Повышенные уровни в экзосомальной фракции пациентов, обследованных через 1.5–2 года после ИИ, имели белки комплемента: C1q, C1s, C1r, образующие комплекс макромолекул C1 и инициирующие классический путь комплемента, C7 компонент комплемента, который входит в комплекс мембранной атаки, а также различные иммуноглобулины. Повышенные уровни белков системы комплемента и иммуноглобулинов, выявленные в экзосомальной фракции пациентов на поздних сроках после ИИ, наблюдались на фоне пониженного уровня белка каллестатина, предположительно участвующего в противодействии воспалительным реакциям, ретинол-связывающего белка и транстиретина. Необходимо отметить, что в недавнем исследовании было показано, что низкий уровень сывороточного транстиретина, оцененного в первый месяц и через год после инсульта, оказался независимым предиктором неблагоприятного исхода ИИ [24].

Полученные данные дают основание предполагать, что период 1.5–2 года после ИИ может оказаться принципиально важным для оценки процессов, связанных с постинсультным

иммуновоспалением и его распространением с привлечением экзосомального транспорта [23]. Для проверки этого предположения был проведен сравнительный анализ белковых профилей экзосом пациентов, разделенных на две группы: пациенты, обследованные в период до года после ИИ, и пациенты, обследованные более, чем через года после ИИ.

Сравнительный анализ уровней белков экзосом сыворотки крови пациентов, обследованных в периоды до года и более года после ИИ. На рис. 5 приведена тепловая карта, на которой представлены результаты иерархической кластеризации белков и образцов пациентов, обследованных до года и более года после ИИ.

При иерархической кластеризации произошло разделение образцов по белковым профилям групп пациентов, обследованных до года и более года после ИИ, которое в целом подтвердило результаты, полученные при попарном сравнительном анализе уровней белков экзосом сыворотки крови пациентов через 1 месяц и 1.5–2 года после ИИ. При сравнении экзосомальных белковых профилей пациентов, обследованных до года после ИИ с данными пациентов, обследованных в период более года после ИИ, были выявлены повышенные уровни белков C1q, C1s, C1r, образующие



комплекс макромолекул C1 комплемента, C7 компонента комплемента и различных иммуноглобулинов. Также в экзосомальной фракции сыворотки крови у этих пациентов были выявлены повышенные уровни фибриногена, фактора фон Виллебранда, известного не только своей гемостатической ролью, но и в качестве одного из медиаторов сосудистого воспаления [25] и фибронектина. По данным ряда исследований фибронектин, белок, связанный с интегринами, участвует в индукции периваскулярного отложения амилоида- β после инсульта [26, 27].

ОБСУЖДЕНИЕ

Пациенты, принявшие участие в исследовании, перенесли ИИ легкой/средней степени тяжести. Полученные результаты указывают на то, что даже относительно невысокий уровень повреждения структур головного мозга, приводящий к ишемическим изменениям, может активировать иммунные и воспалительные процессы как в самом мозге, так и за его пределами, провоцируя длительные системные нарушения в периферических органах.

Известно, что экзосомы задействованы в патофизиологии ИИ [28–30]. Сравнительная оценка протеома экзосом сыворотки крови пациентов на разных сроках после ИИ выявила достоверные изменения в уровнях примерно 30 белков между ранним и поздним постинсультным периодом. В частности, на поздних сроках после ИИ в экзосомальной фракции сыворотки крови пациентов были выявлены повышенные уровни некоторых белков системы комплемента, иммуноглобулинов, фактора фон Виллебранда и фибронектина по сравнению с показателями пациентов, обследованных до года после ИИ.

Хорошо известно, что система комплемента задействована в патофизиологии ИИ, и часто ее активация на поздних сроках связана с неблагоприятным исходом [31, 32]. Показано также, что активация каскадов свертывания крови дополнительно генерирует воспалительные сигналы [33]. Недавние исследования свидетельствуют о том, что активированные после инсульта эндотелиальные и иммунные клетки и иммунные комплексы могут способствовать тромбовоспалению, аберрантной и чрезмерной активации иммунотромбоза [34]. Совокупность функционально связанных между собой процессов воспаления и коагуляции способна усугублять реакции, запущенные ишемическим повреждением мозга, и способствовать вторичным осложнениям инсульта на поздних сроках восстановления [35]. Ранее было показано, что экзосомы содержат белки воспаления, которые способствуют распространению воспаления после травмы головного мозга, включая инсульт [36]. Выявленные повышенные уровни белков, связанных с иммунной

системой и свертываемостью крови в экзосомальной фракции сыворотки крови у пациентов, обследованных более года после ИИ, по сравнению с ранним периодом после ИИ свидетельствуют о возможном участии экзосом в распространении иммуновоспаления, приводящего к вторичным осложнениям. Достоверно повышенное количество экзосом в сыворотке крови пациентов, обследованных в период 1.5–2 года после ИИ, по сравнению с показателями пациентов, обследованных на более ранних сроках, косвенно подтверждает это предположение.

Полученные результаты также подтверждают многочисленные исследования о многофазности иммунного ответа при восстановлении после ИИ, подчеркивая различную степень выраженности системного воспаления на ранних и поздних стадиях заболевания [35]. Ранее было показано, что в острой фазе после инсульта периферическая иммунная система быстро активируется в ответ на повреждение головного мозга, вызванное инсультом. За этим первым острым системным ответом следует состояние иммуносупрессии, которое характеризуется потерей и резистентностью иммунных клеток. Хроническая, менее изученная фаза после ИИ характеризуется устойчивым остаточным воспалением низкой степени тяжести, которое потенциально способно влиять на долгосрочный исход пациентов после ИИ [23]. Полученные результаты могут свидетельствовать о более высоком уровне активации иммунной системы на отдаленных сроках после инсульта по сравнению с ранним постинсультным периодом и указывают на участие экзосом в этих процессах.

В настоящее время большинство критериев, оценивающих долгосрочные последствия инсульта, опираются на клинические данные пациентов с ограниченным использованием информации об их молекулярно-биохимических показателях. Поэтому дальнейшее исследование динамики изменения количества и молекулярно-биохимических показателей экзосом на отдаленных сроках после инсульта позволит получить информацию, необходимую для более объективной оценки рисков неблагоприятных исходов ИИ, связанных с иммуновоспалением, и поиска потенциальных мишеней для их снижения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ГБУЗ ГKB им. М.П. Кончаловского ДЗМ: зав. отделением, врачу-неврологу Владимировой Е.Е. и нейропсихологу Ереминой Н.Н. за предоставление клинической информации по пациентам; сотрудникам ЦКП “Протеом человека” ИБМХ им. В.Н. Ореховича за выполнение хромато-масс-спектрометрического анализа предоставленных проб и помощь в обработке и интерпретации полученных результатов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект номер 21-75-20112).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Исследование проведено в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и одобрено этическим комитетом ГБУЗ Научно-практического психоневрологического центра имени З.П. Соловьева ДЗМ (протокол № 42 от 23.08.2019).

Информированное согласие. Информированное согласие было получено от всех испытуемых, участвовавших в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E., Cushman M., Das S.R., Deo R., de Ferranti S.D., Floyd J., Fornage M., and Gillespie C. // *Circulation*. 2017. V. 135. P. e146–e603.
2. Langhorne P., Bernhardt J., and Kwakkel G. // *Lancet*. 2011. V. 377. P. 1693–1702.
3. Chavez L.M., Huang S.S., MacDonald I., Lin J.G., Lee Y.C., and Chen Y.H. // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. V. 18. P. 2270.
4. Bernhardt J., Hayward K.S., Kwakkel G., Ward N.S., Wolf S.L., and Borschmann K. // *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2017. V. 31. P. 793–799.
5. Carmichael S.T., Kathirvelu B., Schweppe C.A., and Nie E.H. // *Experimental Neurology*. 2017. V. 287. P. 384–394.
6. Kwakkel G., Kollen B.J., van der Grond J., and Prevo A.J. // *Stroke*. 2003. V. 34. P. 2181–2186.
7. Azizi F., Askari S., Javadpour P., Hadjighassem M., and Ghasemi R. // *EXCLI J*. 2020. V. 19. P. 1590–1606.
8. Peng G.P., Yuan Y., Wu S.S., He F.P., Hu Y.W., and Luo B.Y. // *Transl. Stroke Res*. 2015. V. 6. P. 437–445.
9. Pathan M., Fonseka P., Chitti S.V., Kang T., Sanwlan R., Van Deun J., Hendrix A., and Mathivanan S. // *Nucleic Acids Res*. 2019. V. 47. P. D516–D519.
10. Doyle L.M., and Wang M.Z. // *Cells*. 2019. V. 8. P. 727.
11. Jiang L., Chen W., Ye J., and Wang Y. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 115.
12. Venkat P., Chen J., and Chopp M.J. // *Cereb. Blood Flow. Metab*. 2018. V. 38. P. 2165–2178.
13. Lee E.C., Ha T.W., Lee D-H., Hong D-Y., Park S-W., Lee J.Y., Lee M.R., and Oh J.S. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. P. 8367.
14. Lyden P. // *Stroke*. 2017. V. 48. P. 513–519.
15. Nasreddine Z.S., Phillips N.A., Bedirian V., Charbonneau S., and Whitehead V. // *J. Am. Geriatr. Soc*. 2005. V. 53. P. 695–699.
16. Zigmond A.S., and Snaith R.P. // *Acta Psychiatr. Scand*. 1983. V. 67. P. 361–370.
17. Novikova S., Shushkova N., Farafonova T., Tikhonova O., Kamyshinsky R., and Zgoda V. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21. P. 1–29.
18. Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M.Y., Geiger T., Mann M., and Cox J. // *Nat. Methods*. 2016. V. 13. P. 731–740.
19. Yu S-H., Kyriakidiu O., and Cox J. // *J. Proteome Res*. 2020. V. 19. P. 3945–3954.
20. Park J.H., Hong K.S., Lee J., Kim Y.J., and Song P. // *Eur. J. Neurol*. 2013. V. 20. P. 671–80.
21. Sniderman A.D., and Faraj M. // *Curr. Opin. Lipidol*. 2007. V. 18. P. 633–7.
22. Rassart E., Desmarais F., Najyb O., Bergeron K-F., and Mounier C. // *Gene*. 2020. V. 756. P. 144874.
23. Simats A., and Liesz A. // *EMBO Mol. Med*. 2022. V. 14. P. e16269.
24. Ambrosius W., Michalak S., Kazmierski R., Andrzejewska N., and Kozubski W. // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0179806.
25. Gragnano F., Sperlongano S., Golia E., Natale F., Bianchi R., Crisci M., Fimiani F. Parigiano I., Diana V., Carbone A., Cesaro A., Concilio C., Limongelli G., Russo M., and Calabro P. // *Mediators Inflamm*. 2017. V. 2017. P. 5620314.
26. Romberger D.J. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 1997. V. 29. P. 939–43.
27. Furr J.W., Morales-Scheiing D., Manwani B., Lee J., and McCullough L.D. // *Neuromolecular Med*. 2019. V. 21. P. 369–390.
28. Zhang Z.G., and Chopp M. // *J. Clin. Invest*. 2016. V. 126. P. 1190–1197.
29. Pluta R., and Jablonski M. // *Cerebral Ischemia*. Exon Publications. 2021. Nov. 6.
30. Jiang L., Chen W., Ye J. and Wang Y. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 115.
31. Széplaki G., Szegedi R., and Hirschberg K. // *Atherosclerosis*. 2009. V. 204. P. 315–320.
32. Alawieh A., Elvington A. and Tomlinson S. // *Front Immunol*. 2015. V. 6. P. 417.
33. Delvaeye M. and Conway E.M. // *Blood*. 2009. V. 114. P. 2367–2374.
34. Stark K. and Massberg S. // *Nat Rev Cardiol*. 2021. V. 16. P. 666–682.
35. Ladecola C., Buckwalter M.S. and Anrather J. // *J. Clin. Invest*. 2020, V. 130. P. 2777–2788.
36. Kerr N., Garcia-Conteras M., Abbassi S., Mejias N.H., Desousa B.R., Ricordi C., Dietrich W.D., Keane R.W. *Front. Mol. Neurosci*. 2018. V. 11. P. 1662–5099.

Quantitative and Qualitative Analysis of Serum Exosomes at Different Stages after Ischemic Stroke

M. Yu. Zhanina^{1,2}, T. A. Druzhkova¹, A. A. Yakovlev^{1,2}, A. B. Guekht^{1,3}, and N. V. Gulyaeva^{1,2}

¹*Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia*

²*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

³*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

Ischemic stroke (IS) is one of the leading causes of long-term disability worldwide. At the same time, there is still no unequivocal understanding of the reasons for the varying degrees and speed of recovery of patients after IS. Recovery from IS is due to the highly organized interaction of brain structures and cells with other organs and tissues and involves a number of pathophysiological processes occurring both inside and outside the brain. Exosomes are involved in modulating pathophysiological processes after IS by mediating cell-tissue communication, primarily by delivering cargo such as proteins and microRNAs. A comparative quantitative analysis of the protein profiles of serum exosomes of patients examined at different stages after IS was carried out. Protein levels are associated with immune system functioning and coagulation in the serum exosomes of patients examined 1.5–2 years after IS was significantly higher compared to the parameters of patients examined in the earlier post-stroke period. The results indicate an increased level of immune system activation in the long post-stroke period compared to the early post-stroke period and the involvement of exosomes in this process. Further study of the molecular and biochemical parameters of exosomes in the long-term post-stroke period will allow us to assess the risks of functional outcomes of more fully IS and find potential targets for their reduction.

Keywords: exosomes, serum, ischemic stroke, mass spectrometry, proteomics

НИНА КОНСТАНТИНОВНА ПОПОВА (10.02.1929–28.09.2024)



С глубоким прискорбием сообщаем, что 28 сентября 2024 года на 96-м году жизни скончалась Нина Константиновна Попова — основатель научного направления физиологической генетики, выдающийся ученый в области нейрхимии и нейрогеномики поведения, профессор, доктор медицинских наук, заслуженный деятель науки Российской Федерации. Более полувека Нина Константиновна возглавляла созданную ею лабораторию в Институте цитологии и генетики СО РАН. За прошедшие годы дважды менялось название лаборатории, расширялся список используемых моделей, совершенствовались методы исследований с усилением молекулярно-генетического аспекта, но основное направление — изучение роли медиаторов мозга в регуляции нормального и патологического поведения, оставалось неизменным. Нина Константиновна является основателем отечественной школы по изучению роли серотонина в регуляции физиологических функций и поведения. Под ее

руководством впервые показана ключевая роль серотонина в регуляции таких адаптивных функций организма как зимняя спячка и каталепсия. Нина Константиновна является автором и соавтором более 300 научных публикаций, в числе ее учеников 6 докторов и 29 кандидатов наук. Ее многочисленные ученики продолжают развивать направления, заложенные Ниной Константиновной. Нина Константиновна много лет была членом редколлегии журнала «Нейрохимия»/Neurochemical Journal.

Жизнелюбие, активность, остроумие, интеллигентность и всеобъемлющая доброта Нины Константиновны служили ориентиром для окружающих ее учеников и коллег, для всех родных и близких. В наших воспоминаниях она навечно останется великим ученым и мудрым наставником, всегда готовым оказать помощь.

Коллеги, ученики, друзья