

# СОВРЕМЕННАЯ НЕЙРОБИОЛОГИЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Сборник статей

III Всероссийской конференции с международным участием

(г. Уфа, 26-27 сентября 2024 г.)



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
УФИМСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ НАУКИ И ТЕХНОЛОГИЙ**

**СОВРЕМЕННАЯ НЕЙРОБИОЛОГИЯ:  
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

*Сборник статей  
III Всероссийской конференции с международным участием  
(г. Уфа, 26 – 27 сентября 2024 г.)*

Научное электронное издание сетевого доступа

**Уфа  
РИЦ УУНиТ  
2024**

УДК 581.4.591.4.576.31.581.1

ББК 28.06.28.073

C56

*Печатается по решению кафедры биологии и экологии УУНиТ.  
Протокол № 1 от 09.09.2024 г.*

***Редколлегия***

д-р биол. наук, профессор **З.Р. Хисматуллина** (*отв. редактор*);

канд. биол. наук, доцент **А.М. Федорова** (*отв. секретарь*);

ассистент **Давлетбаева А.Р.**

**Современная нейробиология: фундаментальные исследования и практи-**  
С56 **ческие аспекты:** сборник статей III Всероссийской конференции с между-  
народным участием (г. Уфа, 26 – 27 сентября 2024 г.) / отв. ред. З.Р. Хисматул-  
лина. [Электронный ресурс] / Уфимск. ун-т науки и технологий. – Уфа: РИЦ  
УУНиТ, 2024. – 206 с. – URL: <https://uust.ru/digital-publications/2024/191.pdf> –  
Загл. с титула экрана.

ISBN 978-5-7477-5968-8

Сборник содержит научные статьи, посвященные актуальным вопросам анатомии и физиологии нервной системы, психологии и высшей нервной деятельности в норме и при патологии. Представлены результаты оригинальных исследований.

Предназначено для широкого круга читателей, интересующихся проблемами морфологии и физиологии нервной системы.

УДК 581.4.591.4.576.31.581.1

ББК 28.06.28.073

ISBN 978-5-7477-5968-8

© УУНиТ, 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Алов А.В., Пахомов К.В., Васильев Д.С.</b> Нарушение формирования коры головного мозга у детёнышей крыс, подвергшихся воздействию 2,3,7,8-Тетрахлородибензодиоксина в эмбриогенезе.....	6
<b>Байгильдина А.А.</b> endogenous inhibitor of NA,K-ATPASE in nerve cells: general characteristics .....	12
<b>Бакулина Е.И., Юданова А.Д., Романова И.Д., Инюшкин А.Н.</b> Влияние центрального ядра миндалевидного комплекса на паттерн поведения крыс в условиях покоя и хронического стресса.....	14
<b>Баюнова Л.В., Деркач К.В., Зорина И.И., Шпаков А.О.</b> Терапия метформином восстанавливает экспрессию гипоталамических генов, ответственных за центральную регуляцию метаболизма и выживаемость нейронов у самцов крыс с неонатальной моделью сахарного диабета 2 типа.....	20
<b>Быкова М.Е., Пущина Е.В., Варакин А.А.</b> Экспрессия нестина и виментина в нейрональных стволовых клетках и клетках-предшественниках в мозжечке молодых симы <i>Oncorhynchus Masou</i> в конститутивном и репаративном нейрогенезе. ....	28
<b>Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Щербицкая А.Д., Михель А.В.</b> Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на радиальную миграцию нейробластов в кортикальную пластинку крыс .....	33
<b>Гизатуллина А.А., Валова Я.В., Каримов Д.О.</b> Оценка экспрессии гена нейротрофина BDNF в гиппокампе у крыс после воздействия парацетамола в условиях хронического стресса.....	37
<b>Деркач К.В., Шпаков А.О.</b> Инсулин-зависимые центральные механизмы регуляции глюкозного гомеостаза .....	42
<b>Деркач К.В., Зорина И.И., Шпаков А.О.</b> Влияние d2-агониста бромокриптина, в том числе в комбинации с метформином, на гипоталамические сигнальные системы у самцов крыс с метаболическим синдромом, вызванным ограничением грудного вскармливания .....	50
<b>Дурнев Н.А., Кузнецов В.А., Инюшкина Е.М.</b> Анализ спектральной мощности некоторых ритмов ээг при использовании очков виртуальной реальности у студентов.....	56
<b>Ерениев С.И., Соколов Е.Ю., Степанов С.С., Семченко В.В.</b> Фундаментальное обоснование защиты головного мозга при черепно-мозговой травме путем перехода в гипобиотическое состояние .....	60
<b>Журавлева М.А., Инюшкин А.Н.</b> Особенности модулирующего влияния блокады кисспептиновых рецепторов на ночное поведение крыс в установке «темно-светлая камера» .....	68
<b>Заерко А.В.</b> Постнатальный онтогенез гистаминергических нейронов мозга.....	72
<b>Зиматкин С.М.</b> Иммуногистохимия в исследованиях нейронов мозга.....	77

<b>Киреева И.И.*</b> , <b>Садртдинова И.И.</b> , <b>Фархутдинов Р.Г.</b> Влияние экстракта <i>CIRSIIUM ARVENSE</i> на уровень депрессивности крыс линии WAG/RIJ в тесте «Вынужденное плавание».....	83
<b>Климуть Т.В.</b> , <b>Заерко А.В.</b> Нейроны поясной коры мозга крысы при холестазе .....	87
<b>Клюка Г.Г.*</b> , <b>Пущина Е.В.</b> , <b>Капустянов И.А.</b> Липид, связывающий протеин в продолговатом мозге молодежи тихоокеанской кеты в условиях интактности и при травматическом воздействии.....	92
<b>Колос Е.А.</b> , <b>Бекетова А.А.</b> , <b>Яковлев В.С.</b> Коннексин-43 в клетках спинномозгового ганглия эмбрионов крысы .....	97
<b>Конашенкова А.Т.</b> , <b>Ведясова О.А.</b> , <b>Павленко С.И.</b> Роль р2-рецепторов ретротрапециевидного ядра в регуляции дыхания у крыс.....	101
<b>Лебедева А.И.</b> , <b>Мусина Л.А.</b> , <b>Шангина О.Р.</b> , <b>Галаутдинов М.Ф.</b> , <b>Гареев Е.М.</b> Морфологические особенности нервной ткани коры головного мозга после фармакупунктурного воздействия аллогенным биоматериалом в условиях вынужденной физической нагрузки .....	106
<b>Михрина А.Л.</b> , <b>Романова И.В.</b> Экспрессия рецепторов дофамина, серотонина и лептина в помк-иммунопозитивных нейронах ядра одиночного тракта.....	112
<b>Моренова К.А.</b> , <b>Ведясова О.А.</b> Изменения альфа-ритма и вариабельности кардиоритма у правой, левой и амбидекстров при мысленном выполнении движений.....	116
<b>Муртазина Р.З.</b> , <b>Гайнетдинов Р.Р.</b> Гетерологическая экспрессия рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами .....	121
<b>Мусина Л.А.</b> , <b>Хисматуллина З.Р.</b> , <b>Шангина О.Р.</b> , <b>Лебедева А.И.</b> , <b>Гайнетдинов Р.Р.</b> Электронно-микроскопическое исследование сетчатки глаза крыс DAT-KO .....	125
<b>Прокофьев А.С.</b> , <b>Макеева Е.А.</b> , <b>Митрохина Е.О.</b> Реальный крылонебный узел, его связи и размещение в крыловидно-небной ямке.....	131
<b>Пушкин Д.В.</b> , <b>Савченков А.В.</b> Межатомные взаимодействия в структурах активных фармацевтических ингредиентов.....	140
<b>Пьянков А.А.</b> , <b>Морина И.Ю.</b> , <b>Романова И.В.</b> Анализ барьерных свойств сосудистого сплетения третьего желудочка мозга при моделировании сердечно-сосудистой патологии у крысы Sprague-Dawley.....	143
<b>Романова И.В.</b> , <b>Деркач К.В.</b> , <b>Морина И.Ю.</b> , <b>Шпаков А.О.</b> Влияние антагонистов рецептора тиреотропного гормона на гипоталамические, гипофизарные и периферические звенья тиреоидной оси у самцов крыс, в том числе стимулированных тиролиберином .....	148
<b>Самсонова Е.А.</b> , <b>Романова И.Д.</b> Влияние базолатерального ядра миндалевидного комплекса на формирование алкогольной зависимости крыс.....	156

<b>Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М.</b> Пренатальная гипергомоцистеинемия влияет на структурную и ультраструктурную организацию дорсального гиппокампа в онтогенезе крыс .....	161
<b>Туманова Н.Л., Дубровская Н.М., Васильев Д.С., Наливаева Н.Н.</b> Возможность фармакологической коррекции поведенческих нарушений и нейродегенеративных изменений в теменной коре у трансгенных мышей линии 5XFAD .....	166
<b>Федорова А.М., Вебер А.В., Давлетбаева А.Р.</b> Структурные особенности гиппокампа крыс на фоне воздействия наночастиц диоксида титана в эмбриональный период развития .....	170
<b>Цейликман В.Э., Цейликман О.Б.</b> Нейробиологические аспекты постравматических стрессорных расстройств с позиции новой концепции природы этого заболевания .....	177
<b>Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.</b> Кальций-связывающий белок S100B в клетках проэпикарда крысы .....	181
<b>Шаяхметов Р.И., Хисматуллина З.Р.</b> Влияние васкуляризации на гетерогенность глиобластомы.....	186
<b>Шпаков А.О., Деркач К.В.</b> Рецептор лютеинизирующего гормона: участие в сигнальной трансдукции, активация гонадотропинами и аллостерическая регуляция .....	191
<b>Шпаков А.О., Деркач К.В., Шпакова Е.А.</b> Влияние интраназально вводимых пептидов, производных 5-НТ1В- и 5-НТ6-Серотониновых рецепторов, на 5-НТ1В- и 5-НТ6-Опосредуемую регуляцию аденилатциклазы в стриатуме мозга крыс .....	199

**НАРУШЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
У ДЕТЁНЫШЕЙ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ  
2,3,7,8-ТЕТРАХЛОРОДИБЕНЗОДИОКСИНА В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ**

Алов А.В.<sup>1\*</sup>, Пахомов К.В.<sup>2</sup>, Васильев Д.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ИЭФБ РАН им. И.М. Сеченова, г. Санкт-Петербург, Россия

\* aloff.anton@yandex.ru

2,3,7,8-тетрахлордибензодioxин, или ТХДД - одно из сильнейших токсичных веществ антропогенного происхождения, имеющее особенность накопления в пищевой цепи и обладающий мутагенными, тератогенными, иммуносупрессивными и эмбриотоксическими свойствами. В силу большого периода полураспада он влияет и на пораженный организм, и на потомство. Механизмы воздействия диоксина на нервную систему активно исследуются в настоящее время. Однако влияние ТХДД на пролиферацию клеток-предшественников клеток коры головного мозга потомства, миграцию нейробластов и апоптоз кортикальных нейронов в раннем постнатальном онтогенезе изучено крайне слабо. В данной работе с помощью метода прижизненного мечения пролиферирующих клеток формирующегося мозга 5'этинил-2'дезоксинуридином было исследовано влияние ТХДД на радиальную миграцию нейробластов в височной коре мозга крысят.

**Ключевые слова:** ТХДД, миграция, кора, нейрогенез, нейроны  
**IMPAIRED FORMATION OF THE CEREBRAL CORTEX IN RAT  
PUPS EXPOSED TO 2,3,7,8 - TETRACHLORODIBENZODIOXIN  
DURING EMBRIOGENESIS**

Alov A.V.<sup>1\*</sup>, Pakhomov K.V.<sup>2</sup>, Vasiliev D.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> I.M. Sechenov IEFB RAS, St. Petersburg, Russia

\* aloff.anton@yandex.ru

2,3,7,8 - tetrachlorodibenzodioxin, or TCDD, is one of the strongest toxic substances of anthropogenic origin, known to be accumulated in the food chain and possessing mutagenic, teratogenic, immunosuppressive and embryotoxic properties. Due to its long half-life, it affects both the affected organism and the offspring. Currently, there are many studies on the mechanisms of dioxin's effects on the nervous system. However, the effect of TCDD on proliferation of progenitor cells, neuroblast migration into the cortical plate, and apoptosis of cortical neurons in early postnatal ontogenesis is poorly understood. In this study, the effect of TCDD on the radial migration of neuroblasts in the rat temporal cortex was investigated using the EdU cell labeling method.

**Keywords:** TCDD, migration, cortex, neurogenesis, neurons

## **Актуальность**

2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксин или ТХДД – наиболее токсичный представитель семейства диоксинов, стойкий органический загрязнитель антропогенного происхождения. В той или иной степени человек постоянно подвергается его воздействию из-за способности вещества накапливаться в пищевой цепи [1]. К тяжёлым последствиям для здоровья может также привести разовое воздействие высоких доз ТХДД, например, при техногенных авариях на производствах [2,3].

Имеющиеся данные по влиянию ТХДД на организм человека и других животных показывают, что вещество вызывает различные нарушения во всех тканях, зачастую с хроническими последствиями. Молекулярно-клеточные механизмы воздействия охватывают широкий спектр генов и сигнальных путей, на которые ТХДД оказывает модулирующее действие.

На нервную систему и нейрогенез ТХДД также оказывает множественное влияние. Нарушается клеточный цикл и метаболизм в нервных клетках [4], синтез определённых гормонов и нейромедиаторов [5, 6], экспрессия некоторых нейроспецифических генов [7, 8], активируется апоптотическая гибель клеток [9, 10, 11]. В конечном итоге в нервной ткани проявляются три основных эффекта: апоптоз, снижение пролиферативной активности клеток-предшественников нейронов (neural progenitor cells, NPC) и нарушению дифференцировки нервных клеток [12].

Однако в настоящее время крайне слабо изучено влияние ТХДД *in utero* на миграцию нейробластов при формировании коры головного мозга в эмбриогенезе – это важнейший процесс, определяющий цитоархитектонику и тесно связанный и с пролиферацией NPC, и с дифференцировкой, а также определяющий элиминацию избытка клеток в постнатальный период по механизму апоптотической гибели. Выяснение влияния ТХДД на механизмы нейрогенеза крайне важно для понимания механизмов и последствий внутриутробного действия ТХДД, а необходимость экспериментальной проверки возможности нарушений пролиферации, миграции и последующей элиминации нейробластов определяют цель данной работы:

Изучение характера радиальной миграции нейробластов, образовавшихся на 14-й эмбриональный день (E14), в формирующуюся кортикальную пластинку височной коры головного мозга у крысят, подвергшихся воздействию ТХДД *in utero*.

## **Материалы и методы**

Эксперименты на животных проводились в соответствии с Директивой Совета Европейского Сообщества № 86/609 по уходу за лабораторными животными. Беременные самки крыс популяции Вистар были взяты из вивария ИЭФБ РАН. Еда и вода давались без ограничений. Момент оплодотворения контролировали по вагинальным мазкам. Перед родами самок рассаживали в отдельные клетки с теми же условиями содержания. ТХДД, растворённый в оливковом масле в концентрации 1 мкг/кг веса тела

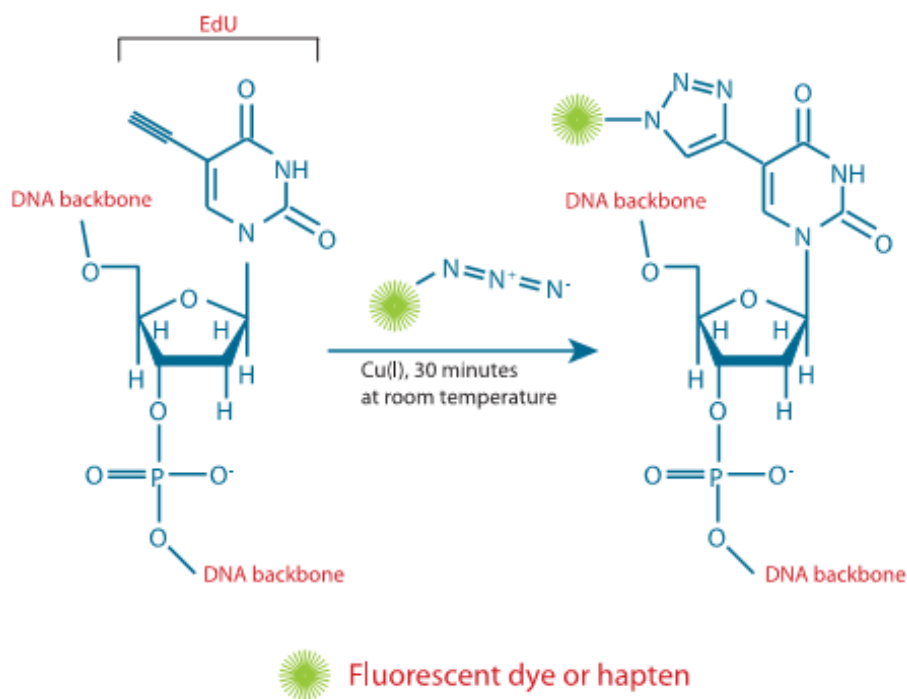


животного вводился трём самкам однократно перорально при помощи зонда на 11 день беременности. Контрольной группе вводилось чистое оливковое масло. На 14 день беременности самкам из контрольной и опытной групп однократно вводили маркер ДНК-репликации 5'-этинил-2'-дезоксисуридин (EdU, внутривентрикулярно, 25 мг/0,5 мл физраствора) для мечения клеток, образующихся в вентрикулярной и субвентрикулярной зоне. Самкам из контрольной группы вводился физиологический раствор. После нормального родоразрешения на 5 день крысята забирались на анализ количества и расположения EdU-позитивных клеток, а на 20 день – для определения активности каспазы-3 в ткани височной коры (рис.1).



Рис. 1. Дизайн исследования

Суть метода исследования миграции клеток заключается в мечении клеток 5'-этинил-2'-дезоксисуридином (EdU). EdU встраивается в синтезирующуюся ДНК пролиферирующих клеток и остаётся в ядрах нейробластов, образовавшихся в момент введения. Таким образом, метод позволяет визуализировать клетки, пролиферирующие и мигрирующие в определённый момент времени. В норме клетки, образующиеся на 14 день входят в состав 5–6 слоёв кортикальной пластинки. Это первые проекционные клетки, которые входят в функциональные нейронные ансамбли кортикальной пластинки коры мозга – кортикальные миниколонки. Визуализация EdU не требует использования антител и денатурации нитей ДНК. Флюорохром-конъюгированная азидная молекула проникает в клетку и ковалентно пришивается к EdU (рис. 2). В данном эксперименте использовался флюорохром Alexa 488.



*Рис. 2.* Схема реакции между молекулой EdU и флюорохром-конъюгированной азидной молекулой. Из инструкции производителя (Invitrogen)

Полученные с помощью криотомии срезы мозга (10 мкм) пятидневных крысят (P5) метили EdU с использованием набора Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit (Invitrogen, США) для выявления окончательного расположения клеток, появившихся на E14. Для изучения характера миграции и расположения меченых кортикальных нейронов в височной коре (Bregma +0,20 мм по Paxinos and Watson 2006) подсчитывали количество меченных EdU клеток в пределах всего участка ткани шириной 700 мкм (от I кортикального слоя до VI). В каждом исследуемом срезе коры вычисляли количество EdU-позитивных клеток в верхних («Зона 1» – I, II, III слои) и нижних («Зона 2» – IV, V, VI) слоях, а также процентное отношение клеток в каждой Зоне к общему количеству (Зона 1+ Зона 2). Затем проводился статистический анализ. Окрашенные срезы исследовались с помощью флуоресцентного микроскопа Imager A (Zeiss, Германия) с использованием цифровой камеры AxioCam 712 Color (Zeiss, Германия) и приложения ZEN 3.4 (Zeiss, Германия). Подсчёт производился вручную с помощью бесплатной программы PhotoM (Россия).

Для полуколичественной оценки активности каспаз, распознающих последовательность DEVD применялся колориметрический набор Caspase-3 Assay Kit. Анализ основан на спектрофотометрическом обнаружении хромофора *p*-нитроанилина (*p*-NA), образующегося после расщепления меченого субстрата DEVD-*p*-NA. Ткань височной коры мозга двадцатидневных крыс (P20) гомогенизировалась, и центрифугировалась; супернатант инкубировался с реакционным буфером. Оптическая плотность измерялась с помощью спектрофотометра CLARIOstar plus

(«BMG Labtech», Германия). Активность каспазы-3 определяли, сравнивая результаты опытного образца с результатами контроля, предварительно поделив их на значения уровня белка в пробах. Затем проводили статистическое сравнение между двумя группами.

### Результаты и обсуждение

Меченые EdU ядра нейронов имели зелёное свечение (рис. 3). Метод прижизненного мечения пролиферирующих клеток EdU позволил точно определить пространственное положение мигрирующих на E14 клеток у контрольной и опытной групп, а также провести сравнительный анализ их распределения в верхних и нижних слоях коры.

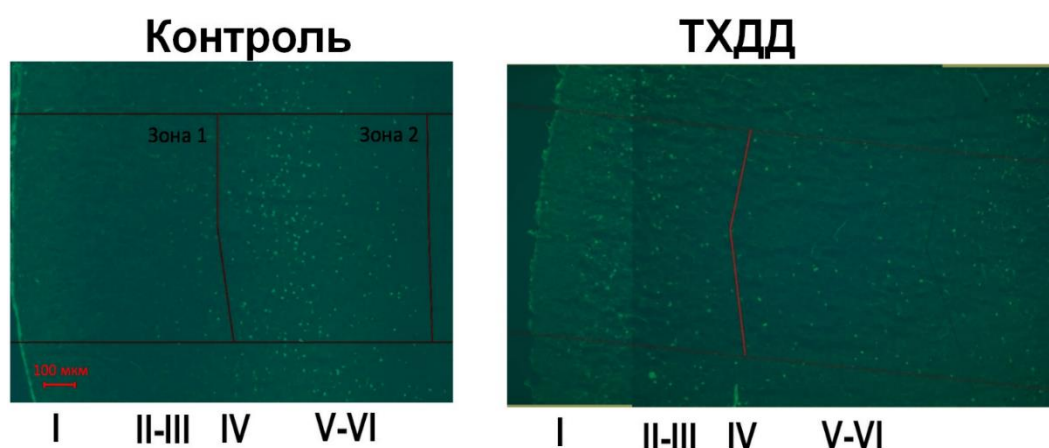


Рис. 3. Окрашенные EdU на E14 срезы мозга P5 крысят, височная кора. Увеличение объектива 10х. EdU-позитивные клетки имеют светло-зелёное свечение. I-VI – примерное расположение слоёв височной коры  
Зона 1 соответствует I-III слоям, Зона 2 – IV-VI слоям.  
Ширина исследуемой области – 700 мкм.

Было показано снижение общего количества EdU-позитивных клеток у опытной группы. Такой результат говорит о снижении доли мигрировавших на E14 нейробластов, что, в свою очередь, может сигнализировать об уменьшении пролиферативной активности NPC.

Анализ распределения EdU-позитивных нейронов в височной коре внутри групп показал, что большинство мигрирующих на E14 нейробластов в норме расположены на уровне нижних слоёв (Зона 2). При ТХДД примерно половина нейробластов мигрирующих на E14 перемещаются в поверхностные слои (II-III слои, Зона 1), их распределение по слоям кортикальной пластинки можно охарактеризовать как равномерно рассеянное. Это свидетельствует о нарушениях миграции нейробластов при воздействии ТХДД.

При ТХДД увеличивается количество нейронов с неправильным пространственным расположением (в верхних слоях), а доля клеток с правильным положением (в нижних слоях), закономерно, снижается. Таким образом, сравнение процентного соотношения клеток в верхних и нижних слоях относительно общего их количества в сравнении между группами позволило примерно количественно оценить разницу

в количестве ошибочно и правильно мигрировавших нейробластов между группами животных. Количество ошибочных миграций при ТХДД примерно в два раза больше, чем в норме.

Кратное увеличение активности каспазы-3 в группе ТХДД свидетельствует о выраженном протекании апоптотической клеточной гибели в височной коре крысят на P20. Именно на P20 в норме фиксируется пик элиминации неправильно мигрировавших и избыточных нейронов путём апоптоза. [13, 14] В опытной группе данный процесс, по всей видимости, происходит намного более активно вследствие массовых нарушений радиальной миграции нейробластов в пренатальный период. При этом прямое действие ТХДД на кортикальные нейроны также может вносить определённый вклад в такую гибель.

Таким образом, на данной модели впервые было показано нарушение кортикальной миграции и пролиферации клеток в нейрогенезе. Полученные результаты вносят вклад в более детальное понимание причин нарушений в нервной деятельности при пренатальном воздействии ТХДД, а также являются морфологическим подтверждением существующих представлений о молекулярных механизмах действия ТХДД на нервную систему. Полученные данные могут быть применены для уточнения этих механизмов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация о финансировании работы. Исследования выполнены в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

### **Список литературы**

1. Всемирная организация здравоохранения, «Диоксины», 2023.
2. Heres L, Hoogenboom R, Herbes R, Traag W, Urlings B. Tracing and analytical results of the dioxin contamination incident in 2008 originating from the Republic of Ireland.
3. Hites RA. Dioxins: an overview and history. *Environ Sci Technol*. 2011 Jan 1;45(1):16–20.
4. Szychowski, K.A.; Wnuk, A.; Kajta, M.; Wójtowicz, A.K. Triclosan activates aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent apoptosis and affects Cyp1a1 and Cyp1b1 expression in mouse neocortical neurons. *Environ. Res.* 2016, 151, 106–114.
5. Tomasini M. C. et al. Prenatal exposure to 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo-p-dioxin produces alterations in cortical neuron development and a long-term dysfunction of glutamate transmission in rat cerebral cortex. *Neurochemistry International* 61, 2012, 759–766.
6. Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C. Rat Thyroid Hyperplasia Induced by Gestational and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *Endocrinology*, May 2003, 144(5):2075–2083.

7. Yang Zhang et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Promotes Astrocyte activation and the secretion of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Via PKC/SSeCKS- dependent mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 2014, 129(5).
8. Talia E. Gileadi et al. Effects of Low-Dose Gestational TCDD Exposure on Behavior and on Hippocampal Neuron Morphology and Gene Expression in Mice. *Environmental Health Perspectives*, 2021, Volume 129, Issue 5.
9. Guangfei Xu, Jiao Liu, Katsuhiko Yoshimoto, Gang Chen, Takeo Iwata, Noriko Mizusawa, Zhiqing Duan, Chunhua Wan, Junkang Jiang. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces expression of p27kip1 and FoxO3a in female rat cerebral cortex and PC12 cells. *Toxicology Letters* 2014, Volume 226, Issue 3, Pages 294-302
10. Guangfei Xu, Qiang Zhou, Chunhua Wan, Ying Wang, Jiao Liu, Yuanye Li, Xiaoke Nie, Chun Cheng, Gang Chen. 2,3,7,8-TCDD induces neurotoxicity and neuronal apoptosis in the rat brain cortex and PC12 cell line through the down-regulation of the Wnt/b-catenin signaling pathway *NeuroToxicology*, 2013, 37 63–73.
11. Kim, S.Y.; Lee, H.G.; Choi, E.J.; Park, K.Y.; Yang, J.H. TCDD alters PKC signaling pathways in developing neuronal cells in culture. *Chemosphere* 2007, 67, S421–S427.
12. Ludmila Juricek and Xavier Coumoul. The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2504.
13. Оленев С.Н. Развивающийся мозг. Клеточные, молекулярные и генетические аспекты нейроэмбриологии // Л.: Наука, 1978, 222 с.
14. Lossi, L., Cantile, C., Tamagno, I., & Merighi, A. Apoptosis in the mammalian CNS: Lessons from animal models. *The Veterinary Journal*, 2005, 170(1), 52–66.

© Алов А.В., Пахомов К.В., Васильев Д.С., 2024

УДК 577.151.63

## **ENDOGENOUS INHIBITOR OF NA, K-ATPASE IN NERVE CELLS: GENERAL CHARACTERISTICS**

Байгильдина А.А.\*

St Joseph University in Tanzania, Dar es Salaam, Tanzania

\* baigildinaasia@mail.ru

A reversible inhibitor of a Na, K - ATPase with a molecular weight of approximately 190 kDa was isolated from rat brain tissue. This compound contains a morpholine ring and has an enzyme inhibition constant of  $4 \times 10^{-7}$  M. It does not have any structural analogues among the known endogenous inhibitors of this enzyme.

**Keywords:** Na, K - ATPase, activity correctors, nerve cells

**Background.** The issue of isolating, identifying, and characterizing endogenous inhibitors of Na, K - ATPase in nerve cells is not only of theoretical interest, but also has practical applications. Solving this problem could lead to the development of new drugs for treating conditions related to dysregulation of this enzyme, such as Parkinson's disease, epilepsy, and migraines [1, 2, 3].

**Research objective:** Isolation and purification of an endogenous inhibitor of the Na, K - ATPase from the rat brain, determination of its molecular weight, kinetic characteristics, and possible chemical structure.

### **Materials and Methods.**

A combination of methods was used: gel chromatography on Sephadex G-25 (Fine), ion exchange, ascending paper chromatography, electrophoresis on paper in pyridine-acetate buffer, high-performance liquid chromatography on silica gel, and reverse-phase column chromatography. The ability of the isolated compounds to inhibit the Na, K - ATPase was evaluated using the method developed by N.R. Elaev [4]. The molecular weight of an endogenous inhibitor we isolated was determined using gel column chromatography, following the method described by G. Determann [5]. The reference substances used in the study were oxytocin, glutathione, glycine, and sodium carbonate. The kinetic parameters of enzymatic reactions were evaluated using standard methods. To qualitatively study the isolated inhibitor, nuclear magnetic resonance ( $^{13}\text{C}$ ) and 2D spectroscopy were used. The results were analyzed using non-parametric statistical methods.

### **Results and discussion.**

It was discovered that the molecular weight of the inhibitor we isolated is approximately 190 Da. The inhibitor is soluble in both water and methanol. When dissolved, it becomes positively charged. Additionally, it retains its inhibitory properties even after boiling for 10 minutes. Kinetically, it is reversible, complete (interaction constants:  $\alpha = 13$ ,  $\beta = 1$ ), high affinity ( $K_i = 4.0 \times 10^{-7}$  M), competitive ( $K_m = 6.0 \times 10^{-4}$  M,  $K_{m_i} = 1.2 \times 10^{-3}$  M,  $V_i \text{ max} = 7.6 \mu\text{M P}_n/\text{mg protein} \times \text{hour}$ ) inhibitor of Na, K - ATPase of neurocytes.

According to IR spectroscopy, this inhibitor molecule contains one -N-group and one CO- group. The results of NMR spectroscopy show that the isolated compound contains a morpholine ring. The inhibitor we obtained affects the Na, K - ATPase of neurocytes in two ways: at low concentrations up to  $7.5 \times 10^{-8}$  M it activates the enzyme, whereas at higher concentrations, it inhibits it.

Based on this characteristic of action, the inhibitor we isolated is similar to cardiac glycosides such as strophanthin, ouabain, and others. However, it differs significantly from them in terms of its chemical structure.

The calculations of kinetic constants yielded the following outcomes:

- The Michaelis constant for ATP in the absence of an inhibitor is equivalent to  $6.06 \times 10^{-4}$  M;
- The Michaelis constant for ATP in the presence of an inhibitor is  $6.06 \times 10^{-6}$  M;
- The maximum velocity for the uninhibited reaction is  $7.7 \text{ mol/l} \times \text{sec}$ ;
- For the inhibited reaction, the maximum velocity is  $5.5 \text{ mol/l} \times \text{sec}$ .

The results obtained suggest that the affinity of the isolated inhibitor for Na, K - ATPase is higher than that of the substrate.

We have discovered a new type of inhibitor for Na, K - ATPase in the brains of rats. This inhibitor is a low-molecular-weight compound that is noncompetitive and reversible. Its chemical structure, origin, and other properties are fundamentally different from all known inhibitors of this enzyme. Perspectively, this autogenous compound can be used to develop drugs for the pathogenetic treatment of neurological and psychiatric patients.

### References

1. Elaev N.R. The correlation between the activity of Na, K - ATPase and protein synthesis in the membranes of nerve cells exposed to acetylcholine. *Cytology*. 1978. Vol. 20. No. 8. P. 970–972.
2. Elaev N.R., Andreev V.P., Shavrina N.V. Endogenous activators and inhibitors of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase induced by acetylcholine // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1983. T. 95. No. 2. P. 40–42.
3. Andreev V.P., Elaev N.R., Unzhakov A.R. The regulation of the biosynthesis of Na, K-ATPase and its low-molecular inhibitor by norepinephrine // *Neurochemistry*. 1984. T. 3. No. 4. pp. 443–448.
4. N.R. Elaev. Correlation between the activity of Na, K - ATPase and protein synthesis in the membranes of nerve cells when exposed to acetylcholine. *Cytology*. 1978. T. 20. No. 8. P. 970–972.
5. Determann H. *Gel chromatography, gel filtration, gel permeation, molecular sieves: A laboratory handbook*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1969. 202 p.

© Багильдина А.А., 2024

УДК 612.82

### **ВЛИЯНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОГО ЯДРА МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ПАТТЕРН ПОВЕДЕНИЯ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОКОЯ И ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА**

Бакулина Е.И., Юданова А.Д. \*, Романова И.Д., Инюшкин А.Н.

Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королёва, г. Самара, Россия

\* judanova-nastja@rambler.ru

Эксперимент по исследованию влияния центрального ядра миндалевидного комплекса на паттерн поведения проведен на белых беспородных самках крыс до и после моделирования хронического мягкого стресса (ХМС). Эксперимент проводился в два этапа: первый – проведение центральной амигдалоэктомии, предварительное поведенческое

тестирование и забор крови для оценки выраженности стресс-реакции; второй – моделирование ХМС, повторное поведенческое тестирование и забор крови. Контрольная группа демонстрировала среднюю степень тревожности в состоянии покоя, экспериментальная – низкий уровень тревожности. После ХМС у интактных животных уровень тревожности так же сохранялся на среднем уровне, тогда как экспериментальные крысы после ХМС проявляли высокий уровень тревожности.

**Ключевые слова:** центральное ядро миндалевидного комплекса; хронический стресс; тревожность; черно-белая камера

## **THE INFLUENCE OF THE CENTRAL NUCLEUS OF THE AMYGDALA COMPLEX ON ANXIETY AND PATTERNS OF BEHAVIOR IN RATS UNDER CONDITIONS OF REST AND CHRONIC STRESS**

Bakulina E.I., Yudanov A.D. \*, Romanova I.D., Inyushkin A.N.

Samara University, Samara, Russia

\* judanova-nastja@rambler.ru

An experiment was conducted to study the effect of the central nucleus of the amygdala complex on anxiety and behavior patterns in white mongrel female rats. The experiment consisted of two stages: first, a central amygdectomy, blood sampling, and behavioral tests were performed; then, a simulation of chronic mild stress (CMS) was conducted and repeated blood sampling and behavioral tests were done. The control group showed an average level of anxiety at rest. In contrast, the experimental group showed a low level of anxiety before and after the experiment. After CMS, the level of anxiety remained at an average level in the intact animals, but experienced rats showed a high level of anxiety after CMS.

**Keywords:** central nucleus of the amygdala complex; chronic stress; anxiety; black white chamber

### **Актуальность**

В течение всей жизни организм подвергается стрессу, негативно сказывающемся на физиологическом состоянии и вызывающемся различные заболевания, сопряженные с его пагубным воздействием (поражения мозга, неврозы, заболевания сердечно-сосудистой системы и др.). Ведущую роль в формировании и реализации эмоционально значимых стресс-зависимых реакций играют гиппокамп, передние отделы коры больших полушарий, ядра гипоталамуса и миндалевидный комплекс, структуры которого участвуют в формировании и реализации острого и хронического непредсказуемого стресса [1, 2].

Расширенная миндалина, включающая центральное ядро миндалины и ядро ложа конечной полоски (BNST), представляет собой сложную структуру мозга, которая осуществляет ключевую роль в эмоциональном поведении. Центральное ядро и BNST тесно связаны между собой.



Миндалина традиционно ассоциируется со страхом, а BNST – с тревогой. Однако исследования с использованием эксайтотоксических поражений также показывают, что центральное ядро участвует в развитии тревоги, вызванной стрессом. Авторы подчеркивают роль кортикотропин-релизинг-фактора (CRF) – нейропептида, который высоко экспрессируется в центральном ядре – как анксиогенного фактора, важного при тревожных расстройствах. Ana Paula Ventura-Silva с коллегами обнаружили, что вызванные стрессом изменения в экспрессии рецепторов CRF в BNST ослабевают при нокадауне CRF в центральном ядре [3].

Цель работы: исследование влияния центрального ядра миндалевидного комплекса на паттерны поведения в условиях продолжительного стресса.

## **Материалы и методы**

Эксперимент проведен на белых беспородных самках крыс (масса 260–310 г) до и после моделирования ХМС. Исследование проводилось на двух исследуемых группах: контрольная – животные с нормально функционирующим миндалевидным комплексом; экспериментальная – животные с уничтоженным центральным ядром миндалевидного комплекса электролитическим способом.

Первым этапом эксперимента является проведение по координатам структуры в соответствии с атласом мозга крыс (Р – 1.8 мм, L – 3.8 мм, V – 7.8 мм) операционного вмешательства для билатерального разрушения исследуемой структуры. После полного послеоперационного восстановления крысы обеих групп, подвергались забору проб периферической крови для анализа лейкоцитарной формулы, а так же были подвергнуты исследованию поведения в тестовых установках.

Второй этап заключался в моделировании ХМС, все крысы в течение двух недель подвергались воздействию в непредсказуемой для животных последовательности различных по силе факторов стресса, после чего повторно были проведены заборы крови и поведенческие тесты.

В эксперименте использовали тестовую установку «черно-белая камера», предназначенную для оценки тревожного поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности, при свободном выборе комфортных условий. В исследовании регистрировали латентный период захода в темный отсек, время нахождения в темном и светлом отсеке установки, число переходов между светлой и темной частями камеры и число оценок «риска» – количество выглядываний или частичного выхода из темного отсека в светлый отсек, а так же принюхивание с последующим возвращением в темный отсек.

При помощи программы SigmaPlot 12.5 (SYSTAT Software) был проведен статистический анализ полученных данных. Различия с уровнем  $p < 0,05$  рассматривались как статистически значимые. Shapiro–Wilk test применяли для вычисления нормальности распределения данных в выборках. Levene's test применяли для выявления однородности

распределения выборок. Парный и непарный t-тест, тест Манна-Уитни и тест до и после в статистическом анализе применяли для сравнения выборок. Данные представлены как средние арифметические  $\pm$  стандартное отклонение.

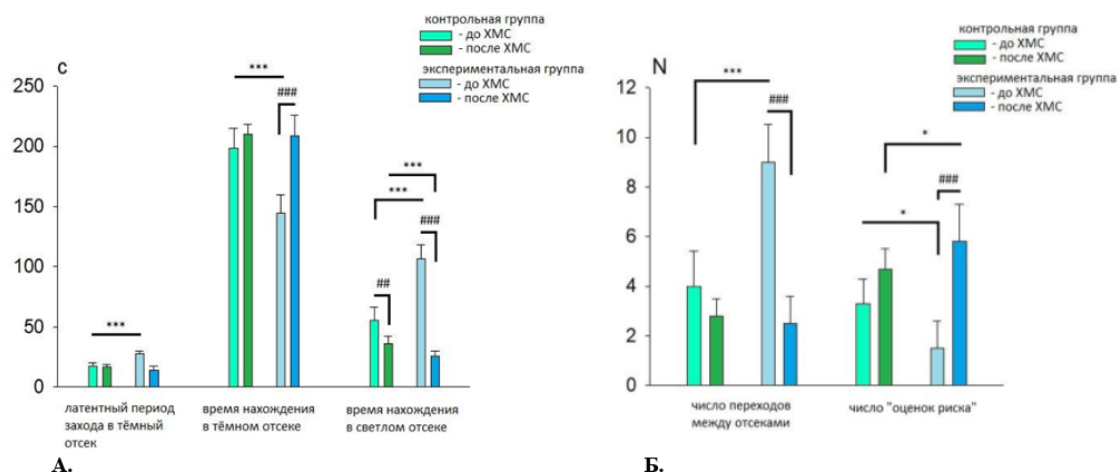
## Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента по исследованию уровня паттернов поведения до и после моделирования ХМС были получены следующие данные.

В покое у крыс экспериментальной группы латентный период захода в темный отсек выше, чем у контрольной группы. Общее время нахождения в темном отсеке в покое у контрольных животных выше, чем у экспериментальных, а вот время нахождения в светлом отсеке ниже в контрольной группе по сравнению с экспериментальной (рис. 1А). Число переходов между отсеками больше у крыс экспериментальной группы, а вот число оценок «риска» наоборот больше в контрольной группе (рис. 1Б).

После ХМС у крыс экспериментальной группы латентный период захода в темный отсек уменьшился по сравнению с покоем и общее время нахождения в темном отсеке увеличилось. После ХМС общее нахождение в светлом отсеке выше у контрольной группы, чем у экспериментальной, при этом данный показатель в обеих группах снизился по сравнению с покоем (рис. 1А). Так же у крыс экспериментальной группы уменьшилось число переходов между отсеками, но повысилось число оценок «риска» по сравнению с показателями, зафиксированными в покое (рис. 1Б).

Животные контрольной группы демонстрируют среднюю степень тревожности в состоянии покоя, так как больше времени находятся в темной камере и имеют значительное число оценок «риска». Напротив животные экспериментальной группы больше времени находятся в светлом отсеке установки, так же у них достаточно высокий показатель латентного периода захода в темный отсек, что говорит о низкой тревожности. А высокий показатель переходов между отсеками у амигдалоэктомированных крыс свидетельствует о доминировании исследовательской деятельности над страхом неизвестности. Из чего следует, что удаление центрального ядра миндалевидного комплекса ведет к снижению выраженности тревожного поведения.



**Временные поведенческие эффекты в состоянии покоя и после ХМС в тесте «Черно-белая камера».**  
 \*\*\* –  $p < 0.005$  (между исследуемыми группами);  
 ## –  $p < 0.01$   
 ### –  $p < 0.005$  (внутри исследуемых групп до и после ХМС).

**Количественные поведенческие эффекты в состоянии покоя и после ХМС в тесте «Черно-белая камера».**  
 \* –  $p < 0.05$   
 \*\*\* –  $p < 0.005$  (между исследуемыми группами)  
 ### –  $p < 0.005$  (внутри исследуемых групп до и после ХМС).

**Рис. 1.** А – Временные, Б – Количественные поведенческие эффекты в состоянии покоя и после ХМС в тесте «Черно-белая камера»

Схожие данные были получены Ana P. Ventura-Silva с соавторами, которые показали, что эксайтотоксические поражения в центральном ядре ослабляют тревожное поведение, вызванное стрессом. Авторы отмечают, что ослабление тревожности, вызванной стрессом, у животных с поражением центрального ядра наблюдалось в условиях стресса, но это не вызывало каких-либо изменений в тревожноподобном поведении у контрольных животных. Другими словами, целостность центрального ядра необходима для установления вызванного стрессом повышенного беспокойства, но не опосредует тревожное поведение само по себе [4].

Paretkar и Dimitrov описали участие нейронов центрального ядра в модуляции тревожноподобного поведения в условиях стресса. Исследователи использовали хемогенетический метод для модуляции активности нейронов кортикотропин-рилизинг-гормона в центральном ядре миндалина, что по итогу усиливали тревожноподобное поведение у мышей [5].

После моделирования ХМС у интактных животных контрольной группы уровень тревожности так же сохраняется на среднем уровне, животные все также предпочитают оставаться в темном отсеке, при этом время нахождения в светлом отсеке стало еще больше, чем до стресса. А вот крысы с удаленным центральным ядром после ХМС проявляют высокий уровень тревожности, по сравнению, как с условиями покоя, так и по сравнению с уровнем тревожности после стресса у контрольных животных. Что может свидетельствовать, о протекании стресс-реакции у амигдало-эктомированных животных после ХМС, что так же подтверждается исследованиями крови (падение количества эозинофилов на фоне возрастания лимфоцитов) (рис. 2). А вот у интактных животных

предположительно, произошла частичная адаптация к воздействию стресса, так как уровень тревожности практически не повысился, да и изменений в качественном составе крови свойственный активной фазе стресс-реакции не наблюдается.

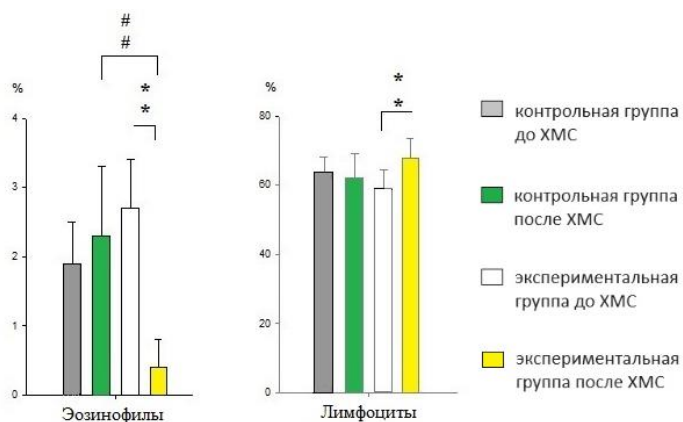


Рис. 2. Процентное содержание эозинофилов и лимфоцитов в периферической крови крыс до и после ХМС

Все процедуры проводились в соответствии с этическими стандартами, утверждёнными правовыми актами РФ, принципами Базельской декларации и рекомендациями комитета по биоэтике биологического факультета Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. McEwen B.S., Nasca C., Gray J.D. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex // *Neuropsychopharmacology*. 2016. No. 1(41). Pp. 3-23.
2. Herman, J.P. Neural control of chronic stress adaptation // *Front Behav Neurosci*. 2013. Vol. 7. Pp. 61-67.
3. Ventura-Silva A.P., Borges S., Sousa N., Rodrigues A.J., Pêgo J.M. Amygdalar corticotropin-releasing factor mediates stress-induced anxiety // *Brain Res*. 2020. Vol. 1729.17 p.
4. Ventura-Silva A.P., Melo A., Ferreira A.C., Carvalho M.M., Campos F.L., Sousa N., Pêgo J.M. Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior // *Front Behav Neurosci*. 2013. Vol. 7. No. 32.7 p.
5. Paretkar T., Dimitrov E. Central Amygdala Corticotropin-releasing hormone (CRH) Neurons Modulation of Anxiety-like Behavior and Hippocampus-dependent Memory in Mice // *Neuroscience*. 2018. Vol. 15. No. 390. Pp. 187-197.

**ТЕРАПИЯ МЕТФОРМИНОМ ВОССТАНАВЛИВАЕТ  
ЭКСПРЕССИЮ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ ГЕНОВ,  
ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ЦЕНТРАЛЬНУЮ РЕГУЛЯЦИЮ  
МЕТАБОЛИЗМА И ВЫЖИВАЕМОСТЬ НЕЙРОНОВ У САМЦОВ  
КРЫС С НЕОНАТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ  
САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА**

Баюнова Л.В. \*, Деркач К.В., Зорина И.И., Шпаков А.О.  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
г. Санкт-Петербург, Россия  
\* bayunoval@mail.ru

Несмотря на то, что метформин широко используется для лечения сахарного диабета 2 типа (СД2) его эффективность и механизмы действия при тяжелых формах СД2, характеризующихся истощением функций поджелудочной железы, изучены недостаточно, а его влияние на генную экспрессию в гипоталамусе вовсе не исследовано. Цель работы состояла в изучении влияния четырехнедельного лечения метформин (200 мг/кг/сутки) половозрелых самцов крыс с неонатально индуцированной моделью СД2 на их метаболические и гормональные показатели и на экспрессию в гипоталамусе генов, кодирующих компоненты сигнальных систем и белки, вовлеченные в апоптоз и митохондриальную динамику. У диабетических крыс метформин восстанавливал массу тела и жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови, толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину. Это было ассоциировано с нормализацией экспрессии ряда гипоталамических генов. Так метформин снижал повышенную при СД2 экспрессию генов орексигенного нейропептида Y (*Npy*) и инсулинового (*InsR*) и лептинового (*ObRb*) рецепторов, повышал сниженную при СД2 экспрессию гена меланокортинового рецептора 4 типа (*Mс4R*), нормализовал соотношение *Mс4R/Mс3R*, а также усиливал экспрессию гена проопиомеланокортина (*Pomc*), стимулируя анорексигенные пути в гипоталамусе, что способствует снижению массы тела и повышению чувствительности к глюкозе и инсулину. Метформин также восстанавливал паттерн экспрессии антиапоптотического белка BCL-2 и соотношение *Bax/Bcl-2*, а также снижал повышенную при СД2 экспрессию генов белка DRP-1 и митофузина-2, что свидетельствует о повышении выживаемости гипоталамических нейронов и нормализации их митохондриального биогенеза. Таким образом, впервые показано восстанавливающее действие метформина на экспрессию гипоталамических генов, вовлеченных в центральную регуляцию метаболизма и выживаемость нейронов, как один из механизмов терапевтического эффекта этого препарата при тяжелых формах СД2.

**Ключевые слова:** гипоталамус, сахарный диабет 2 типа, метформин, инсулин, митохондриальная динамика

**METFORMIN THERAPY RESTORES THE EXPRESSION OF HYPOTHALAMIC GENES RESPONSIBLE FOR THE CENTRAL REGULATION OF METABOLISM AND NEURONAL SURVIVAL IN MALE RATS WITH A NEONATAL MODEL OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS**

Bayunova L.V. \*, Derkach K.V., Zorina I.I., Shpakov A.O.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

\* bayunoval@mail.ru

Despite the fact that metformin is widely used for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM), its effectiveness and mechanisms of action in severe forms of T2DM, characterized by depletion of pancreatic function, have not been sufficiently studied, and its effect on gene expression in the hypothalamus has not been studied at all. The purpose of the work was to study the effect of four-week treatment with metformin (200 mg/kg/day) of mature male rats with a neonatally induced model of T2DM on their metabolic and hormonal parameters and on the expression in the hypothalamus of genes encoding components of signaling systems and proteins involved in apoptosis and mitochondrial dynamics. In diabetic rats, metformin restored body and adipose tissue weight, blood glucose, insulin and leptin levels, glucose tolerance and insulin sensitivity. This was associated with normalization of the expression of a number of hypothalamic genes. Thus, metformin reduced the expression of the orexigenic neuropeptide Y (*Npy*) and insulin (*InsR*) and leptin (*ObRb*) receptor genes, increased in T2DM, increased the expression of the melanocortin receptor type 4 gene (*Mc4R*), which was reduced in T2DM, normalized the *Mc4R/Mc3R* ratio, and also increased the expression proopiomelanocortin (*Pomc*) gene, stimulating anorexigenic pathways in the hypothalamus, which promotes weight loss and increased sensitivity to glucose and insulin. Metformin also restored the expression pattern of the anti-apoptotic protein BCL-2 and the *Bax/Bcl-2* ratio, and also reduced the increased expression of the DRP-1 and mitofusin-2 protein genes in T2DM, which indicates an increase in the survival of hypothalamic neurons and normalization of their mitochondrial biogenesis. Thus, for the first time, the restorative effect of metformin on the expression of hypothalamic genes involved in the central regulation of metabolism and neuronal survival has been demonstrated as one of the mechanisms of the therapeutic effect of this drug in severe forms of T2DM.

**Keywords:** hypothalamus, type 2 diabetes mellitus, metformin, insulin, mitochondrial dynamics

## **Актуальность**

Важнейшими патогенетическими факторами развития осложнений со стороны сердечно-сосудистой, выделительной, нервной и других систем организма при тяжелых, декомпенсированных формах сахарного диабета 2 типа (СД2) являются нарушенная толерантность к глюкозе и обусловленная этим устойчивая гипергликемия, которая сопровождается неспецифическим гликированием множества белков и нарушением их функциональной активности, а также развитие резистентности к инсулину и лептину, что не только нарушает энергетический обмен на периферии, но и пагубно влияет на функционирование ЦНС [1]. При СД2 в значительной степени меняется функциональная активность гипоталамических нейронов, и это во многом обусловлено тем, что гипоталамус играет «первую скрипку» в обеспечении тесной взаимосвязи между метаболическим статусом организма и центральной регуляцией периферического метаболизма и эндокринных функций [2]. Среди гипоталамических сигнальных систем наибольшим изменениям подвергаются те из них, которые регулируются инсулином, лептином, пептидами меланокортинового семейства и их антагонистом, агути-подобным пептидом, а также нейропептидом Y [3]. Наряду с этим в гипоталамических нейронах и глиальных клетках меняется соотношение про- и антиапоптотических белков, а также белков, контролирующих процессы митохондриальной динамики.

Для лечения СД2 в клинике широко применяют антидиабетический препарат метформин, действие которого основано на нормализации активности фермента – АМФ-активируемой протеинкиназы, важнейшего энергетического сенсора клеток, на повышении сниженной при СД2 чувствительности тканей к инсулину и лептину и на восстановлении нарушенного глюкозного и липидного обмена [4]. Однако эффективность и механизмы действия метформина при его использовании для лечения тяжелых форм СД2, которые имеют ряд признаков инсулин-дефицитного СД1, в настоящее время остаются мало исследованными, а влияние метформина на гипоталамические системы вовсе не изучено.

Вследствие этого целью настоящей работы было изучить метаболические и гормональные показатели у половозрелых самцов крыс с «неонатальной» моделью СД2, вызванной обработкой высокой дозой стрептозотоцина (СТЗ) в неонатальном возрасте, а также на экспрессию у них гипоталамических генов, кодирующих ключевые компоненты сигнальных систем и белки, вовлеченные в апоптоз и митохондриальную динамику.

## **Материалы и методы**

Для индукции неонатальной модели СД2 5-суточным крысятам-самцам вводили СТЗ («Sigma», США) в дозе 70 мг/кг (в/б), как описано ранее [5]. В возрасте 3 месяцев у части животных, которых в дальнейшем

рассматривали, как диабетических, развивались признаки СД2: повышение массы тела не менее чем на 8% от таковой в контроле, гипергликемия с уровнем глюкозы натощак выше 6 мМ и нарушенная толерантность к глюкозе, оцениваемая в глюкозотолерантном тесте (ГТТ) по повышению уровня глюкозы через 120 мин после нагрузки выше 8 мМ. Контрольным крысам в неонатальном возрасте вместо СТЗ вводили его растворитель – 0.1 М цитратный буфер (рН 4.5). По достижении 4 месяцев диабетических крыс случайным образом распределяли на 2 группы (в каждой  $n = 12$ ): без лечения (НД) и с 4-недельным лечением метформином в дозе 200 мг/кг/сутки (НДМ). Контрольная группа крыс (К,  $n = 12$ ), как и группа НД, вместо метформина получала плацебо. Метформин вводили перорально с помощью желудочного зонда.

Для оценки толерантности к глюкозе за 3 дня до окончания лечения крыс метформином проводили ГТТ, для чего крысам в/б вводили 40%-ный раствор глюкозы из расчета 2 г/кг массы тела животного. Концентрацию глюкозы измеряли до (точка 0) и через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после нагрузки, используя тест-полоски «One Touch Select» (США) и глюкометр «Life Scan Johnson & Johnson» (Дания). Наряду с этим до и через 120 мин после глюкозной нагрузки в крови оценивали уровни инсулина и лептина, для чего использовали наборы «Rat Insulin ELISA» («Mercodia», Швеция) и «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США). Кровь забирали из хвостовой вены под местным наркозом (лидокаин, 2–4 мг/кг). Рассчитывали индекс инсулиновой резистентности (ИР), как произведение концентраций глюкозы и инсулина до ( $IR_0$ ) и через 120 мин после нагрузки ( $IR_{120}$ ). Перед забоем крыс наркотизировали (хлоралгидрат, в/б, 400 мг/кг), декапитировали и забирали образцы гипоталамуса для анализа экспрессии генов. Количественную РТ-ПЦР осуществляли, как описано ранее [6]. Для оценки сигнала использовали амплификатор «7500 Real-Time PCR System» («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). В качестве референсных были использованы гены 18S-рРНК (*18S rRNA*) и  $\beta$ -актина (*Actb*). Полученные данные рассчитывали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$ , значения RQ рассчитывали относительно экспрессии целевого гена в гипоталамусе контрольной группы, которая была принята за 1.0 [7].

Статистический анализ осуществляли с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007», результаты представляли как  $M \pm SEM$ . Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро–Уилка. Для сравнения 2 выборок с нормальным распределением использовали  $t$ -критерий Стьюдента, для сравнения 3 групп – дисперсионный анализ с поправкой Тьюки. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

### **Результаты и обсуждение**

У крыс с неонатальным СД2 были повышены масса тела и абдоминального жира, доля жировой ткани, базовый уровень глюкозы, значение  $AUC_{0-120}$  для глюкозных кривых в ГТТ, стимулированная глюкозой



концентрация инсулина, базовая и стимулированная глюкозой концентрации лептина и индекс  $IR_{120}$  (табл. 1). При этом базовый уровень инсулина и индекс  $IR_0$  в группе НД не отличались от таковых в контроле. Четырехнедельная обработка метформином в различной степени восстанавливала эти показатели (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют в пользу улучшения метаболического статуса, чувствительности к глюкозе, инсулину и лептину у крыс с СД2, леченных метформином, что указывает на эффективность метформинотерапии при сравнительно тяжелой форме СД2, которая воспроизводится с помощью неонатальной модели, для которой характерны начальные стадии ослабления инсулин-продуцирующей функции поджелудочной железы [8].

Изучение экспрессии гипоталамических генов, кодирующих компоненты сигнальных систем привело к следующим результатам. При СД2 отмечали повышение экспрессии генов *Npy*, *ObRb* и *InsR*, кодирующих орексигенный нейропептид Y и рецепторы лептина и инсулина, в то время как экспрессия гена *Mc4r*, кодирующего меланокортиновый рецептор 4 типа, напротив, снижалась почти в 3 раза (табл. 2). Лечение метформином приводило к нормализации экспрессии *ObRb* и *InsR*, значительному повышению экспрессии гена *Pomc*, кодирующего про-опиомеланокортин, прекурсор меланокортиновых пептидов, а также к нормализации сниженного в группе НД соотношения гена *Mc4r* и гена *Mc3r*, кодирующего меланокортиновый рецептор 3 типа. При этом экспрессия гена *Agrp*, кодирующего агути-подобный пептид, в группах НД и НДМ существенно не менялась (табл. 2). Полученные данные указывают на то, что в условиях СД2 в гипоталамусе крыс преобладают анорексигенные пути, на что указывает повышение уровня экспрессии нейропептида Y и снижение экспрессии гена ключевого компонента анорексигенного меланокортинового пути – меланокортинового рецептора 4 типа, через который свои эффекты реализует  $\alpha$ -меланоцитстимулирующий гормон. Это может быть одной из причин гиперфагии и ожирения у диабетических животных. Нами ранее было показано, что в условиях ожирения, ассоциированного с ИР, транспорт инсулина и лептина в мозг ослабевает, что приводит к снижению концентрации этих гормонов, ослаблению их сигнальных каскадов в гипоталамусе и, как следствие, к нарушению центральной регуляции энергетического обмена [6]. Проявленное повышение экспрессии рецепторов инсулина и лептина у крыс с СД2 может быть компенсаторной реакцией в ответ на снижение уровня этих гормонов в ЦНС, включая гипоталамус. Лечение крыс метформином нормализовало экспрессию генов *Npy*, *InsR*, *ObRb* и *Mc4R* и усиливало экспрессию гена *Pomc*, тем самым активируя гипоталамические механизмы, ответственные за снижение аппетита, массы тела и улучшение энергетического обмена на периферии, которые мы отмечали в группе НДМ.

Таблица 1.

Масса тела и жировой ткани, доля жира, уровни глюкозы, инсулина и лептина и индексы инсулиновой резистентности, в том числе через 120 мин после глюкозной нагрузки, а также значение  $AUC_{0-120}$  для глюкозных кривых в ГТТ у половозрелых самцов крыс с неонатальной моделью СД2, и влияние на эти показатели четырехнедельного лечения метформином (200 мг/кг/сутки)

Показатель	Контроль	НД	НДМ
Масса тела, г	355±6	419±10 <sup>a</sup>	352±9 <sup>b</sup>
Масса АЖ, г	4.6±0.2	11.1±0.7 <sup>a</sup>	5.5±0.4 <sup>b</sup>
Масса ЭЖ, г	3.3±0.2	6.4±0.5 <sup>a</sup>	3.7±0.3 <sup>b</sup>
Доля жира, %	2.2±0.1	4.1±0.3 <sup>a</sup>	2.6±0.1 <sup>b</sup>
Глюкоза <sub>(0)</sub> , мМ	4.3±0.2	6.0±0.3 <sup>a</sup>	4.8±0.2 <sup>b</sup>
Глюкоза <sub>(120)</sub> , мМ	5.0±0.3	7.6±0.4 <sup>a</sup>	5.7±0.3 <sup>b</sup>
$AUC_{0-120}$ , усл. ед.	1130±41	1637±76 <sup>a</sup>	1234±36 <sup>b</sup>
Инсулин <sub>(0)</sub> , нг/мл	0.75±0.09	0.62±0.08	0.80±0.11
Инсулин <sub>(120)</sub> , нг/мл	0.87±0.12	1.40±0.16 <sup>a</sup>	0.86±0.13 <sup>b</sup>
Индекс $IR_{(0)}$ , усл. ед.	3.22±0.37	3.84±0.34	3.81±0.33
Индекс $IR_{(120)}$ , усл. ед.	4.32±0.47	10.62±1.02 <sup>a</sup>	4.79±0.65 <sup>b</sup>
Лептин <sub>(0)</sub> , нг/мл	1.23±0.23	3.17±0.34 <sup>a</sup>	1.95±0.42
Лептин <sub>(120)</sub> , нг/мл	1.40±0.25	5.27±0.51 <sup>a</sup>	2.16±0.23 <sup>b</sup>

*Примечание.* АЖ и ЭЖ – абдоминальный и эпидидимальный жир.  $IR_{(0)}$  и  $IR_{(120)}$  – значения индекса ИР натощак и через 120 мин после глюкозной нагрузки в ГТТ, то же для уровней глюкозы, инсулина и лептина в крови. Различия с контролем (<sup>a</sup>) и группой НД (<sup>b</sup>) статистически значимы при  $p < 0.05$ . Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

Изучение гипоталамических генов, вовлеченных в регуляцию апоптоза и митохондриальной динамики, показало, что у крыс с СД2 без лечения в два раза снижена экспрессия гена *Bcl-2*, кодирующего антиапоптотический белок BCL-2, а также повышено соотношение экспрессии гена проапоптотического белка *Bax* и гена *Bcl-2* (табл. 2). Наряду с этим отмечали повышение экспрессии гена белка *DRP-1*, контролирующего деление внешней мембраны митохондрий [9], и гена *Mfn-2*, кодирующего митофузин-2, ответственный за слияние наружных мембран митохондрий [10], что также указывает на активацию процессов апоптоза. Лечение метформином не только нормализовало соотношение *Bax/Bcl-2*, но и экспрессию генов белков, ответственных за митохондриальную динамику, снижая экспрессию генов *Drp1* и *Mfn-2*, причем в случае митофузина-2 ниже контрольного уровня (табл. 2). Тем самым, осуществлялся сдвиг равновесия в сторону образования в нейронах и глиальных клетках более крупных, функционально активных митохондрий. Эти данные указывают на выраженный антиапоптотический эффект метформиновой терапии в гипоталамусе крыс с неонатальной моделью СД2.

Таблица 2.

Экспрессия экспрессии генов, кодирующих сигнальные белки и маркеры апоптоза и митохондриальной динамики, в гипоталамусе крыс с СД2, и влияние на нее лечения метформином

Ген	Контроль	НД	НДМ
<i>InsR</i>	1.03±0.06	1.76±0.09 <sup>a</sup>	1.22±0.15
<i>ObRb</i>	1.00±0.08	1.84±0.12 <sup>a</sup>	0.94±0.09 <sup>b</sup>
<i>Mc4R</i>	1.05±0.11	0.36±0.02 <sup>a</sup>	0.82±0.05 <sup>b</sup>
<i>Mc3R</i>	0.99±0.03	1.14±0.12	0.81±0.07
<i>Pomc</i>	1.06±0.15	1.35±0.09	2.84±0.29 <sup>a,b</sup>
<i>Npy</i>	1.02±0.06	1.71±0.07 <sup>a</sup>	1.33±0.13
<i>Agrp</i>	1.01±0.04	1.28±0.20	1.39±0.11
<i>Bax</i>	1.03±0.07	1.08±0.05	1.13±0.16
<i>Bcl-2</i>	1.06±0.03	0.45±0.04 <sup>a</sup>	1.37±0.08 <sup>b</sup>
<i>Drp-1</i>	1.01±0.13	2.15±0.08 <sup>a</sup>	0.76±0.10 <sup>b</sup>
<i>Mfn-1</i>	1.13±0.11	1.30±0.08	1.14±0.05
<i>Mfn-2</i>	1.03±0.02	1.73±0.07 <sup>a</sup>	0.40±0.06 <sup>a,b</sup>

## Заключение

Таким образом, длительная терапия крыс со сравнительно тяжелой формой СД2 метформином, взятым в дозе 200 мг/кг/сутки, вызывала частичное восстановление метаболических (масса тела и жировой ткани, уровни глюкозы в крови и толерантность к глюкозе) и гормональных (уровни инсулина и лептина в крови, индекс ИР) показателей. Это было ассоциировано с вызываемой метформином нормализацией экспрессии ряда генов, кодирующих компоненты сигнальных систем и белки, вовлеченные в апоптоз и митохондриальную динамику, в гипоталамусе диабетических животных. Так метформинная терапия снижала повышенную при СД2 экспрессию генов нейропептида Y (*Npy*), инсулинового (*InsR*) и лептинового (*ObRb*) рецепторов, повышала сниженную при СД2 экспрессию гена меланокортинового рецептора 4 типа (*Mc4R*) и нормализовала соотношение *Mc4R/Mc3R*, а также усиливала экспрессию гена проопиомеланокортина (*Pomc*), тем самым, стимулируя гипоталамические анорексигенные пути, способствующие снижению массы тела и жировой ткани и повышению чувствительности к глюкозе, инсулину и лептину. Одним из механизмов этого может быть восстановление паттерна экспрессии антиапоптотического белка BCL-2, его соотношения с проапоптотическим белком BAX, а также снижение повышенной при СД2 экспрессии генов белков DRP-1 и митофузина-2, что свидетельствует о нормализации митохондриального биогенеза и снижении рисков митохондриального апоптоза.

Работа поддержана государственным заданием ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

Все процедуры, выполненные с участием животных (самцы крыс Wistar), в полной мере соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и рекомендациям биоэтического комитета ИЭФБ РАН, протокол заседания № 2-3/2023 от 28.02.2023 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Alonge K.M., D'Alessio D.A., Schwartz M.W. Brain control of blood glucose levels: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes // *Diabetologia*. 2021. Vol. 64. No. 1. Pp. 5–14.

2. Scherer T., Sakamoto K., Buettner C. Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease // *Nature Reviews Endocrinology*. 2021. Vol. 17. No. 8. Pp. 468–483.

3. Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M. Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases // *Future Science OA*. 2015. Vol. 1. No. 3. P. FSO25.

4. Dutta S., Shah R.B., Singhal S., Dutta S.B., Bansal S., Sinha S., Haque M. Metformin: A Review of Potential Mechanism and Therapeutic Utility Beyond Diabetes // *Drug Design, Development and Therapy*. 2023. Vol. 17. Pp. 1907–1932.

5. Derkach K.V., Moyseyuk I.V., Chistyakova O.V., Shpakov A.O. Androgen deficiency in male rats with prolonged neonatal streptozotocin diabetes // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013. Vol. 155. No. 3. Pp. 339–342.

6. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect // *PLoS One*. 2019. Vol. 14. No. 3. P. e0213779.

7. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method // *Nature Protocols*. 2008. Vol. 3. No. 6. Pp. 1101–1108.

8. Argun-Kurum G., Kaya-Dagistanli F., Ozturk M. DPP4 inhibitor induces beta cell regeneration and DDR-1 protein expression as an endocrine progenitor cell marker in neonatal STZ-diabetic rats // *Pharmacological Reports*. 2019. Vol. 71. No. 4. Pp. 721–731.

9. Singh S., Sharma S. Dynamin-related protein-1 as potential therapeutic target in various diseases // *Inflammopharmacology*. 2017. Vol. 25. No. 4. Pp. 383–392.

10. Kulkarni P.G., Mohire V.M., Bhaisa P.K., Joshi M.M., Puranik C.M., Waghmare PP, Banerjee T. Mitofusin-2: Functional switch between mitochondrial function and neurodegeneration // *Mitochondrion*. 2023. Vol. 69. Pp. 116–129.

© Баюнова Л.В., Деркач К.В., Зорина И.И., Шпаков А.О., 2024

**ЭКСПРЕССИЯ НЕСТИНА И ВИМЕНТИНА В НЕЙРОНАЛЬНЫХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ И КЛЕТКАХ-ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ  
В МОЗЖЕЧКЕ МОЛОДИ СИМЫ *ONCORHYNCHUS MASOU*  
В КОНСТИТУТИВНОМ И РЕПАРАТИВНОМ НЕЙРОГЕНЕЗЕ**

Быкова М.Е. \*, Пущина Е.В., Вараксин А.А.

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского  
Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, Россия

\* stykanyova@mail.ru

Перспективно изучение нейрональных стволовых клеток на организмах, способных восстанавливать нервную ткань [1]. Исследовали клетки-предшественники (НКП) и нейрональные стволовые клетки (НСК) в мозжечке молоди симы *O. masou*. Цель работы заключалась в анализе процессов конститутивного и репаративного нейрогенеза после повреждения мозжечка. Оценивали изменения через 2 дня после повреждения с помощью ИГХ анализа экспрессии нестина и виментина. Было показано, что в ходе репаративного нейрогенеза происходит активация нейрогенных ниш, что подтверждает перспективность изучения этих процессов у рыб. Также значительно усиливается пролиферация нестин+ и виментин+ НСК и НКП и их дальнейшая миграция для восстановления повреждённых участков мозга.

**Ключевые слова:** нейрогенез, нейрональные стволовые клетки, нестин, виментин, травма

**EXPRESSION OF NESTIN AND VIMENTIN IN NEURONAL STEM  
CELLS AND PROCURETOR CELLS IN THE CEREBELLA  
OF JUVENILE *ONCORHYNCHUS MASOU* IN CONSTIUTIVE  
AND REPARTIVE NEUROGENESIS**

Bykova M.E. \*, Pushchina E.V., Varaksin A.A.

National Scientific Center for Marine Biology named after A.V. Zhirmunsky,  
Vladivostok, Russia

\* stykanyova@mail.ru

The study of neuronal stem cells in organisms capable of restoring nervous tissue is promising [1]. We studied progenitor cells (NPCs) and neuronal stem cells (NSCs) in the cerebellum of juvenile salmon *O. masou*. The purpose of the work was to analyze the processes of constitutive and reparative neurogenesis after damage to the cerebellum. To assess changes 2 days after injury using IHC analysis of nestin and vimentin expression. It has been shown that during reparative neurogenesis, activation of neurogenic niches occurs, which confirms the promise of studying these processes in fish. The proliferation of nestin+ and vimentin+ NSCs and NPCs and their further migration to restore damaged areas of the brain are also significantly enhanced.

**Keywords:** neurogenesis, neuronal stem cells, nestin, vimentin, injury

## Актуальность

Перспективным подходом к изучению нейрональных стволовых клеток и клеток-предшественников является исследование организмов, способных восстанавливать нервную ткань [1]. Понимание процессов развития и утраты областей, содержащих стволовые клетки, позволит оценить потенциал активации «спящих» стволовых клеток в не-нейрогенных участках мозга человека. Среди позвоночных животных процессы нейrogenеза наиболее выражены у костных рыб [2]. Филогенетически древнее семейство лососёвых (*Salmonidae*) характеризуется высокой концентрацией недифференцированных элементов в мозге и паренхиме [3].

Их эволюция проходила через фетализацию, то есть замедление развития органов и систем, что сохраняет эмбриональное состояние признаков у взрослых особей. Сима, дальневосточный эндемичный вид, подходит для морфогенетических исследований благодаря медленному эмбриональному развитию. Эта особенность позволяет точнее оценивать скорость деления и гибели клеток по сравнению с быстро развивающимися видами, такими как *Danio rerio*.

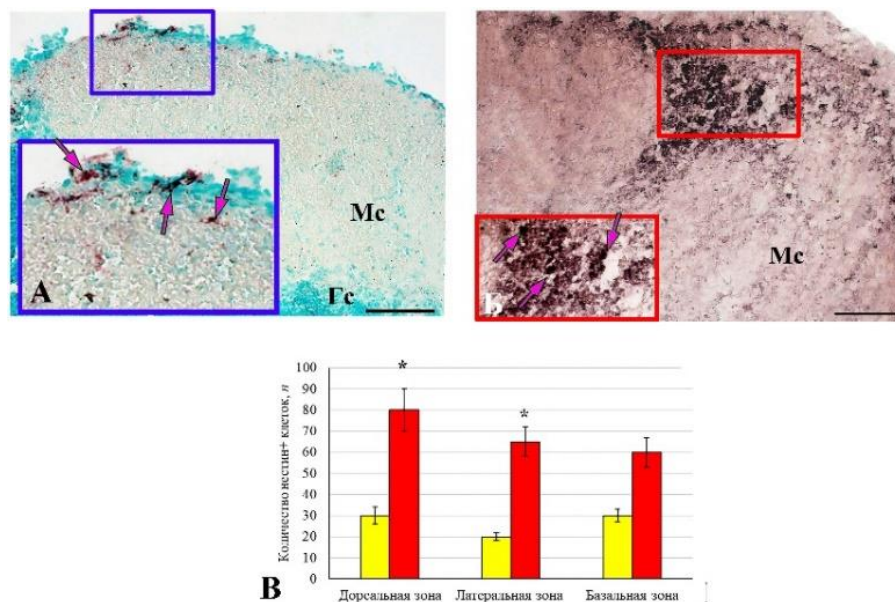
Цель работы: изучение процессов конститутивного и репаративного нейrogenеза, происходящих в мозжечке годовалой особи симы *O. Masou* через два дня после нанесения повреждения.

## Материалы и методы

По методике Зупанка и Отта [4] в дорсальную зону мозжечка была нанесена рана стерильной иглой. Для оценки конститутивного и репаративного нейrogenеза проводилось ИГХ-маркирование замороженных срезов мозга с использованием моноклональных мышиных антител к нестину и виментину – белкам промежуточных филаментов, входящих в состав цитоскелета НСК и НКП (Abcam, Великобритания, разведение 1:300). Через 2 дня после нанесения повреждения и вывода из эксперимента рыбы подвергались эвтаназии. Перед этим проводилась анестезия с использованием раствора MS-222 (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 минут. После криопротекции на замораживающем микротоме Cryo-star HM 560 MB изготавливались фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия). ИГХ-реакция проводилась методом непрямого авидинбиотинового пероксидазного анализа (АВС метод) согласно протоколу производителя. Анализ проводился с использованием специализированного программного обеспечения AxioVision и микроскопа Axiovert 200-M производства Carl Zeiss (Германия). Обработка результатов осуществлялась программами Axioimager и графическим редактором Corel Photo-Paint 12. Для количественной обработки морфометрических данных ИГХ-маркирования применялись программные пакеты Statistica 12 и Microsoft Excel 2010.

## Результаты и обсуждение

Для характеристики мозжечка рассматривались дорсальная, латеральная и базальная зоны. Нами были обнаружены небольшие округлые нестин+ клетки первого типа, лишённые отростков, от 3.5 до 5 мкм (рис. 1).

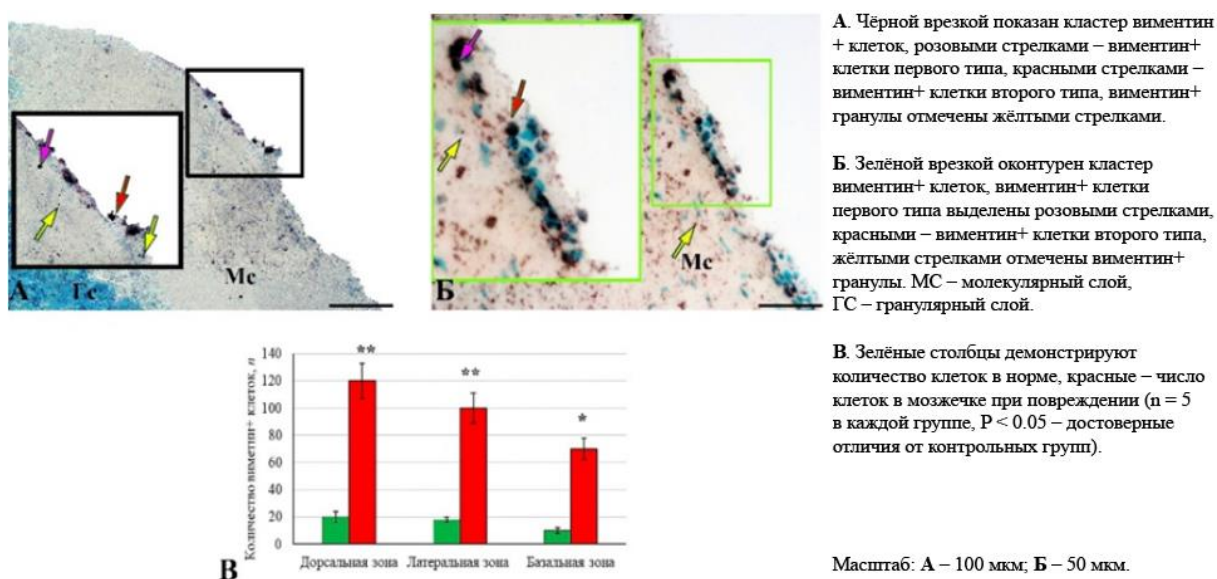


**Рис. 1.** (А) Нестин+ клетки в интактном мозжечке молодежи симы *O. Masou*, синей врезкой обозначено скопление нестин+ клеток, отдельные клетки отмечены розовыми стрелками. (Б) Нестин+ клетки через 2 дня после нанесения повреждения мозжечка молодежи симы *O. masou*. Красной врезкой обозначено скопление нестин+ клеток, розовыми стрелками отмечены нестин+ клетки. (В) Распределение нестин+ клеток в мозжечке молодежи симы *O. masou* в норме и после травмы. Число клеток в интактном мозге представлено жёлтыми столбцами, при повреждении – красными столбцами (n = 5 в каждой группе, P < 0.05 – достоверные отличия от контрольных групп). Масштаб: (А, Б) – 100 мкм

Маркирование виментином выявило округлые клетки первого типа и овальные виментин+ клетки второго типа (рис. 2). В неповреждённом мозге наибольшее количество виментин+ и нестин+ НКП было обнаружено в молекулярном слое. Эти скопления рассматриваются как конститутивные нейрогенные ниши. Единичные нестин и виментин+ НКП располагались на значительном расстоянии друг от друга, что указывает на интенсивные процессы конститутивного нейрогенеза. Проллиферативная активность в интактном мозжечке, вероятно, обеспечивается двумя механизмами: митотической активностью резидентных стволовых клеток и продолжением пролиферации их потомков.

Через 2 дня после повреждения увеличилось количество нестин и виментин+ НКП. После повреждения значительно возросло число

равномерно распределённых на небольшом расстоянии друг от друга виментин и нестин+ НКП. Возможно, это связано с тем, что повреждение стимулирует генетические программы пролиферации взрослых стволовых клеток [5] и нейрональных предшественников, которые создают новые нейроны, необходимые для восстановления [6]. Во время регенеративного нейрогенеза происходит активация дорсальной зоны и возрастает интенсивность процессов пролиферации. Мы предполагаем, что клетки из этой области начинают перемещаться к месту травмы и активируют находящиеся в покое стволовые клетки. В поверхностных нейрогенных нишах увеличивается количество клеток, и их плотность постепенно снижается по мере отдаления от дорсальной области. Мы предполагаем, что виментин является частью цитоскелета делящихся НПК и популяции НСК, активированных в результате травмы.



**Рис. 2.** (А) Виментин+ клетки в интактном мозжечке молодежи симы *O. masou*. (Б) Виментин+ клетки в мозжечке молодежи симы *O. masou* после повреждения. (В) Распределение виментин+ клеток в мозжечке молодежи симы *O. masou*

После повреждения в мозжечке преобладают виментин+ гранулы разного размера и плотности распределения. Они присутствуют как в цитоплазме клеток, так и во внеклеточном матриксе. Возможно, повышение экспрессии виментина после повреждения указывает на интенсификацию пластических процессов в НКП и играет ключевую роль в защите от последствий травмы. Основная доля клеточной пролиферации выявляется в области травмы. В отличие от неповреждённого мозга, новые нейроны мигрируют на значительные расстояния, чтобы заселить поражённые участки мозга [5]. Эндогенные НСК образуются из двух источников: зон пролиферации конститутивного нейрогенеза и реактивных нейрогенных ниш. В интактном мозге НСК не участвуют активно в нейрогенезе, но после травмы их пролиферативная активность



значительно увеличивается. Это приводит к многократному увеличению числа нестин<sup>+</sup> и виментин<sup>+</sup> НКП, формирующих плотные скопления.

## Заключение

После механического повреждения мозжечка формируются реактивные нейрогенные ниши за счет преобразования конститутивных матричных областей. В нейрогенных областях начинается активная пролиферация новых клеток, которые массово мигрируют к месту повреждения, восстанавливая повреждённые ткани. Наибольший вклад в процессы миграции вносят дорсальная и латеральная области.

Эксперименты над животными проводились в соответствии с правилами, установленными Уставом Национального научного центра морской биологии имени А.В. Жирмунского ДВО РАН и Этической комиссией, регулирующей гуманное обращение с подопытными животными (№ 4–031018).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

1. Stocum D.L. Regenerative biology and medicine // Academic Press, Burlington, 2006. Pp. 431.
2. Olivera-Pasilio V., Lasserre M., Castelló M.E. Cell proliferation, migration, and neurogenesis in the adult brain of the pulse type weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* // Frontiers in Neuroscience. 2017. Vol. 11. Article number 437.
3. Pushchina E.V., Shukla S., Varaksin A.A., Obukhov D.K. Cell proliferation and apoptosis in optic nerve and brain integration centers of adult trout *Oncorhynchus mykiss* after optic nerve injury // Neural Regeneration Research. 2016. Vol. 11. Pp. 578–590.
4. Zupanc G.K., Ott R. Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced // Experimental Neurology. 1999. Vol. 160. Pp. 78–87.
5. Barbosa C., Mendes-Faia A., Lage P., Mira N. P., Mendes-Ferreira A. Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii* // Microbial Cell Factories. 2015. Vol. 14. Pp. 124.
5. Kizil C., Kyritsis N., Brand M. Effects of inflammation on stem cells: together they strive? // EMBO Reports. 2015. Vol. 16. Pp. 416–426.
6. Chen M., Puschmann T.B., Marasek P., Inagaki M., Pekna M., Wilhelmsson U., Pekny M. Increased neuronal differentiation of neural progenitor cells derived from phosphovimentin-deficient mice // Molecular Neurobiology. 2018. Vol. 55. Pp. 5478–5489.

© Быкова М.Е., Пущина Е.В., Вараксин А.А., 2024

**ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ  
НА РАДИАЛЬНУЮ МИГРАЦИЮ НЕЙРОБЛАСТОВ  
В КОРТИКАЛЬНУЮ ПЛАСТИНКУ КРЫС**

Васильев Д.С.<sup>1\*</sup>, Туманова Н.Л.<sup>1</sup>, Щербицкая А.Д.<sup>1</sup>, Михель А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, г. Санкт-Петербург, Россия

\* dvasilyev@bk.ru

Описано влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на миграцию нейронов, созревание нервной ткани, экспрессию сигнальных молекул в мозге плода крысы. Ультраструктура тканей коры головного мозга и гиппокампа демонстрировала признаки задержки формирования нейропилия в коре мозга и задержки миелинизации в гиппокампе. Было показано, что пГГЦ нарушает как генерацию, так и радиальную миграцию нейробластов в кортикальную пластинку. Повышенная экспрессия *Bdnf* может влиять на жизнеспособность, расположение и созревание нейрональных клеток у пГГЦ крысят. Таким образом, пГГЦ нарушает механизмы раннего развития мозга, что приводит к задержке созревания ткани мозга.

**Ключевые слова:** гипергомоцистеинемия; кора мозга; нейрональная миграция

**INFLUENCE OF PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA  
ON RADIAL MIGRATION OF NEUROBLASTS  
INTO THE CORTICAL PLATE IN RAT**

Vasilev D.S.<sup>1\*</sup>, Tumanova N.L.<sup>1</sup>, Shcherbitskaia A.D.<sup>1</sup>, Mikhel A.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> D.O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive medicine, St. Petersburg, Russia

\* dvasilyev@bk.ru

The effect of prenatal hyperhomocysteinemia on neuronal migration, neural tissue maturation, and expression of signaling molecules in the fetal rat brain is described. Ultrastructure of cortical and hippocampal tissues showed evidence of delayed neuropil formation in the cerebral cortex and delayed myelination in the hippocampus. It was shown that pHNC impaired both the generation and radial migration of neuroblasts into the cortical lamina. Increased expression of *Bdnf* may affect the viability, location, and maturation of neuronal cells in rat pHNC. Thus, pHNC disrupts the mechanisms of early brain development, resulting in delayed maturation of brain tissue.

**Keywords:** hyperhomocysteinemia; cerebral cortex; neuronal migration

## **Актуальность**

Модель пренатальной гипергомоцистеинемии (пГГЦ) характеризуется задержкой физиологического развития и негативным эффектом на когнитивные функции в постнатальном онтогенезе [2], однако механизмы такого хронического функционального нарушения на настоящее время недостаточно изучены и были исследованы нами в отчётный период. В предыдущих работах среди наиболее характерных структурных изменений при пГГЦ отмечали гибель проекционных пирамидных нейронов в новой коре и дорсальном гиппокампе на фоне развития процесса нейровоспаления [3, 4]. Наибольшей выраженности нейровоспалительные процессы достигали в области CA1 дорсального гиппокампа, которая является важным интегративным центром, тесно связанным с неокортексом. Развитие нейродегенеративного процесса, вызванного пГГЦ, сопровождалось нарушением функции синаптической передачи, что, в частности, выражалось в снижении долговременной потенциации и уменьшении пула лабильных грибовидных дендритных шипиков с шипиковым аппаратом, вовлечённых в её обеспечение [5], что приводило к когнитивному дефициту. Большинство структурных нарушений на модели пГГЦ было исследовано в первый месяц постнатального онтогенеза, когда происходит нормализация уровня гомоцистеина и отмечаются нейровоспалительные процессы, тогда как информация об изменениях в эмбриональный период и на взрослой стадии обрывочна.

Цель исследования: анализ влияния пренатальной гипергомоцистеинемии на радиальную миграцию нейробластов в кортикальную пластинку.

## **Материалы и методы**

При проведении работ был использован разработанный ранее метод дозированной метиониновой нагрузки, создаваемой путем принудительного перорального введения беременным самкам 0,15%-го водного раствора L-метионина (0,10–0,15 г в расчете на животное) ежедневно, начиная с четвертого дня после оплодотворения и до родоразрешения. Размер выборок потомства нормальных самок и самок, перенесших ГГЦ, составлял по 10 животных на каждую возрастную стадию.

На 14-й или 18-й день беременности самкам крыс Вистар из контрольной (n = 4) и пГГЦ (n = 5) групп проводили однократную инъекцию 5'-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) – маркера репликации ДНК. Однократная внутривентрикулярная инъекция в дозировке 25 мг EdU в 0,5 мл физраствора была сделана каждой беременной самке для мечения клеток, образующихся в пролиферативной зоне стенок мозгового пузыря плода. Клетки, помеченные на E14, мигрируют в нижние слои кортикальной пластинки (V и VI), а клетки, помеченные на E18, – в поверхностные (II-III).

Анализировали количество и расположение нейронных клеток, помеченных на E14 или E18. Детенышей декапитировали на пятый день после рождения, когда количество меченых клеток оптимально для количественного анализа. Ткань мозга фиксировали погружением в 10% формалин на фосфатно-буферном солевом растворе (PBS, pH 7,4) в течение 5 дней. Блоки конечного мозга замораживали, на криомикротоме Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия) получали срезы в фронтальной плоскости. Последовательность срезов толщиной 15 мкм с расстоянием между ними 30 мкм (10 срезов на животное) отбирали случайным образом и использовали для визуализации меченых клеток. Визуализацию EdU в ядрах клеток проводили с помощью Click- iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342. Вычисляли общее количество клеток. Исследование препаратов проводили на микроскопе Leica DMR с конфокальным сканером Leica SP5 (Leica Microsystems, Германия). Alexa Fluor 488 возбуждалась при длине волны 488 нм, а Hoechst 33342 – при 350 нм. Эмиссия Alexa Fluor 488 и Hoechst 33342 наблюдалась в диапазонах: 496–537 нм и 430–461 нм соответственно. Количество меченых EdU клеток подсчитывали в области теменной коры шириной 500 мкм от слоя I до VI. В каждом анализируемом срезе коры вычисляли отношение числа EdU-позитивных клеток к общему числу меченых Hoechst клеток. По этому соотношению проводили сравнение групп. Соотношение количества EdU-позитивных клеток, расположенных в поверхностном (слои II–III) и нижнем (V–IV) слоях, также подсчитывали и сравнивали у контрольных и пГГЦ крысят.

### **Результаты и обсуждение**

**Контроль.** Распределение клеток меченых EdU в кортикальной пластинке зависело от времени мечения клеток. В случае мечения клеток на E14, около 79% EdU-позитивных клеток наблюдались в нижних (V–VI) слоях коры. В то же время около 80% клеток, меченных на E18, локализовались в поверхностных (II–III) слоях коры.

**пГГЦ.** В теменной коре 5-дневных крысят, подвергшихся пГГЦ, мы наблюдали снижение (по сравнению с контролем) общего числа EdU-позитивных нейронов, меченных как на E14 ( $p \leq 0,01$ , U-тест Манна-Уитни), так и на E18 ( $p \leq 0,01$ , U-тест Манна-Уитни). Можно предположить, что пГГЦ вызывает заметное снижение скорости деления нейробластов. Как у животных с пГГЦ, так и у контрольных, большинство клеток, меченных на E14, мигрировали в V–VI слои коры. У пГГЦ крысят количество меченых нейронов, локализованных в поверхностных слоях теменной коры, было больше ( $p = 0,03$ , U-тест Манна-Уитни), чем в контроле. Это может свидетельствовать о том, что действие пГГЦ помешало некоторым нейробластам мигрировать в надлежащее место в нижних слоях кортикальной пластинки. Большинство EdU-позитивных клеток, меченных на E18, были рассеяны в поверхностных (II–III) слоях коры как

в контрольной, так и в пГГЦ группах. Однако у пГГЦ крысят количество EdU-позитивных клеток, расположенных в V-VI слоях теменной коры, было увеличено ( $p = 0,01$ , U-тест Манна-Уитни) по сравнению с контрольной группой. Можно предположить, что эти нейробласты не смогли мигрировать на свое место во II–III слоях коры.

Можно сделать вывод, что пГГЦ на E4-E21 нарушает как генерацию, так и радиальную миграцию нейробластов в теменной области кортикальной пластинки. Результаты, полученные на модели пГГЦ демонстрируют сходную картину нарушения нейрогенеза и миграции нейробластов кортикальной пластинки при пГГЦ, пренатальной гипоксии [6], токсического [7] и ультразвукового [8] воздействия на плод в период эмбриогенеза. Таким образом было впервые описано влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на миграцию нейронов в кортикальную пластинку мозга плода крысы.

Исследования выполнены в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

Все эксперименты проводились на крысах в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Arutjunyan A., Milyutina Yu., Shcherbitskaia A., Kerkeshko, G., Zalozniaia, I., Mikhel A. Neurotrophins of the Fetal Brain and Placenta in Prenatal Hyperhomocysteinemia // *Biochemistry (Moscow)* 2020. Vol. 85 P. 248–259.
2. Gao L., et al. Cognitive and Neurochemical Alterations in Hyperhomocysteinemic Rat. / L. Gao, X.N. Zeng, H.M. Guo, X.M. Wu, H.J. Chen, R. K. Di, Y. Wu // *Neurol. Sci.* 2012. Vol. 33. P. 39–43.
3. Shcherbitskaia, A.D., Vasilev, D.S., Milyutina, Y.P., Tumanova, N.L., Mikhel, A.V., Zalozniaia, I.V., Arutjunyan, A.V. Prenatal Hyperhomocysteinemia Induces Glial Activation and Alters Neuroinflammatory Marker Expression in Infant Rat Hippocampus. // *Cells* 2021. Vol. 10: 1536.
4. Shcherbitskaia, A.D., Vasilev, D.S., Milyutina, Y.P., Tumanova, N.L., Mikhel, A.V., Zalozniaia, I.V., Arutjunyan, A.V. Maternal Hyperhomocysteinemia Induces Neuroinflammation and Neuronal Death in the Rat Offspring Cortex // *Neurotoxicity Research*, 2020.38:408–420.
5. Postnikova T.Y. et al. Maternal Hyperhomocysteinemia Produces Memory Deficits Associated with Impairment of Long-Term Synaptic Plasticity in Young Rats. / T.Y. Postnikova, D.V. Amakhin, A.M. Trofimova, N.L. Tumanova, N.M.

Dubrovskaya, D.S. Kalinina, A.A. Kovalenko, A.D. Shcherbitskaia, D.S. Vasilev, A.V. Zaitsev // Cells, 2022. Vol. 12. №1. P. 58.

6. Vasilev D.S. et al. Prenatal hypoxia in different periods of embryogenesis differentially affects cell migration, neuronal plasticity and rat behavior in postnatal ontogenesis. / D.S. Vasilev, N.M. Dubrovskaya, N.L. Tumanova, I.A. Zhuravin // Frontiers in Neuroscience, 2016. Vol. 10. №126. doi: 10.3389/fnins.2016.00126.

7. Kisby G.E. et al. Animal Models of Brain Maldevelopment Induced by Cycad Plant Genotoxins. / G.E. Kisby, Moore H., Spencer P.S. // Birth Defects Res C Embryo Today, 2013. Vol. 99. №4. P. 247–255.

8. Ang, E.S. B. C. et al. Prenatal exposure to ultrasound waves impacts neuronal migration in mice. / E. S. B.C. Ang, V. Gluncic, A. Duque, M.E. Schafer, P. Rakic // Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. Vol. 103. P. 12903–12910.

© Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Щербицкая А.Д., Михель А.В., 2024

УДК 575.117.2

## **ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА НЕЙРОТРОФИНА *BDNF* В ГИППОКАМPE У КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПАРАЦЕТАМОЛА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА**

Гизатуллина А.А.<sup>1\*</sup>, Валова Я.В.<sup>1</sup>, Каримов Д.О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, г. Уфа, Россия

<sup>2</sup> Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко  
г. Москва, Россия

\* alinagisa@yandex.ru

Хронический стресс представляет собой нейроэндокринный ответ с вовлечением симпатической нервной и эндокринной систем, проявляющийся после относительно длительного воздействия стрессоров. Парацетамол является известным во всем мире анальгетиком и антипиретиком. Воздействие на организм психических и токсических стрессоров приводит к вегетативной и нейроэндокринной активации, что в свою очередь проявляется как особые паттерны поведения. Целью исследования стала оценка экспрессии гена нейротрофина *BDNF* в гиппокампе крыс, подверженных воздействию парацетамола и хронического стресса. В качестве экспериментальных животных выступили белые аутбредные крысы в количестве 40 особей со средним весом 200 г, которые были распределены в четыре группы: отрицательный контроль, стресс, парацетамол, парацетамол+стресс. Экспрессия исследуемого гена была снижена в группах, получавших парацетамол. Высокие дозы препарата и его длительное поступление в организм могут провоцировать изменения экспрессии в том числе генов нервной системы.

**Ключевые слова:** хронический стресс; парацетамол; экспрессия генов; ген нейротрофического фактора мозга

## **ASSESSMENT OF BDNF NEUROTROPHIN GENE EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS AFTER EXPOSURE TO PARACETAMOL UNDER CONDITIONS OF CHRONIC STRESS**

Gizatullina A.A.<sup>1\*</sup>, Valova Ya.V.<sup>1</sup>, Karimov D.O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia

<sup>2</sup> National Research Institute of Public Health named after N.A. Semashko, Moscow, Russia

\* alinagisa@yandex.ru

Chronic stress is a neuroendocrine response involving the sympathetic nervous and endocrine systems that occurs after relatively long-term exposure to stressors. Paracetamol is a world-famous analgesic and antipyretic. Exposure to mental and toxic stressors results in autonomic and neuroendocrine activation, which in turn manifests itself as specific behavior patterns. The aim of the study was to evaluate the expression of the neurotrophin gene *BDNF* in the hippocampus of rats exposed to paracetamol and chronic stress. The experimental animals were 40 white outbred rats with an average weight of 200 g, which were divided into four groups: negative control, stress, paracetamol, paracetamol + stress. The expression of the studied gene was reduced in the groups receiving paracetamol. High doses of the drug and its prolonged intake into the body can provoke changes in expression, including genes of the nervous system.

**Keywords:** chronic stress; paracetamol; gene expression; brain-derived neurotrophic factor gene

### **Актуальность**

Нахождение организма в течение длительного времени под воздействием стрессовых факторов ведёт к разбалансировке многих систем. Ослабление иммунитета может проявляться симптомами простудного типа, такими как озноб, першение в горле, повышение температуры тела, мышечная и головная боль [1]. Парацетамол является известным во всем мире анальгетиком и антипиретиком. Однако ввиду доступности и отсутствия строгой схемы применения препарата, существует риск передозировки, поскольку в больших количествах парацетамол может оказывать нефротоксическое и гепатотоксическое действие. Парацетамол вызывает гепатотоксичность у крыс – только при высоких дозах (до 1500 мг/кг). У людей интоксикация вызывается парацетамолом при дозах 150–200 мг/кг [2]. Более длительная передозировка препарата может привести к летальному исходу [3].

Парацетамол может влиять на продукцию нейротрофина в гиппокампе, что, в свою очередь, приводит к поведенческому дефициту, наблюдаемому

в виде повышенной неподвижности и снижения социального признания, а также морфологических перестроек клеток в областях мозга, контролирующими эмоциональное поведение [4].

Цель работы: оценить экспрессию гена нейротрофина *BDNF* в гиппокампе крыс, подверженных воздействию парацетамола и хронического стресса.

## Материалы и методы

Исследование проводилось 28 календарных дней. Для проведения эксперимента были сформированы четыре группы белых аутбредных крыс, по 10 особей в каждой (всего 40 крыс). Животные из трех экспериментальных групп ежедневно получали один из следующих видов взаимодействия: стресс, пероральное введение парацетамола (1000 мг/кг массы тела (100 мг/см<sup>3</sup>)), сочетанное воздействие стресса и парацетамола. Животным, не получающим парацетамол, по аналогичной схеме вводили чистую дистиллированную воду эквивалентно.

Моделирование непредсказуемого хронического стресса производилось аналогично процедуре, описанной Matisz et al. [5]. Ежедневно животные из соответствующих групп взаимодействовали с одним-двумя видами стрессоров так, чтобы данные внешние воздействия не повторялись в порядке и по продолжительности (табл. 1).

Таблица 1.

График воздействия стрессоров

Понедельник	Вторник	Среда	Четверг	Пятница
Социальная изоляция (1,5 часа).	Иммобилизация (30-60 мин).	Социальная изоляция (20 часов).	Шум (2 часа).	Питьевая депривация (24 часа).
Пищевая депривация (24 часа).			Освещение комнаты в ночное время (12 часов).	

Вне стрессовых процедур для животных поддерживались оптимальные стандартные условия вивария с постоянным доступом к пище и воде (влажность 50%, температура 20–25°C, искусственное освещение с 8:00 до 20:00).

Все манипуляции с крысами проводили строго в соответствии с правилами по гуманному и бережному обращению с животными, которые зафиксированы в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Strasbourg, 1986) и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

После окончания эксперимента животных выводили путем декапитации. Гиппокамп помещался в пробирки с реактивом «ExtractRNA» (ЗАО



Евроген, Россия), после чего подвергался мгновенной заморозке с помощью жидкого азота. В соответствии с рекомендациями производителя тотальную РНК экстрагировали из полученной ткани, очищали, синтезировали на её матрице кДНК. Анализ активности гена *BDNF* проводили на приборе «Rotor-Gene» (QIAGEN, Германия) методом ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии контрольных генов оценивали относительно экспрессии конститутивного гена *GAPDH*.

Для оценки уровня экспрессии генов применяли метод  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  [6].

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 21 (IBM, США). Полученные данные проверяли на нормальность, применяя критерий Колмогорова-Смирнова. Затем был проведен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением апостериорных критериев Тьюки и Тамхейна. Данные представлены как среднее арифметическое и среднеквадратичная ошибка. Критический уровень значимости ( $p$ ) принят равным 0.05.

## Результаты и обсуждение

Анализ активности транскрипции гена *BDNF* показал наличие статистически значимых различий между исследуемыми группами  $F = 36,107, p > 0,01$  (рис. 1).

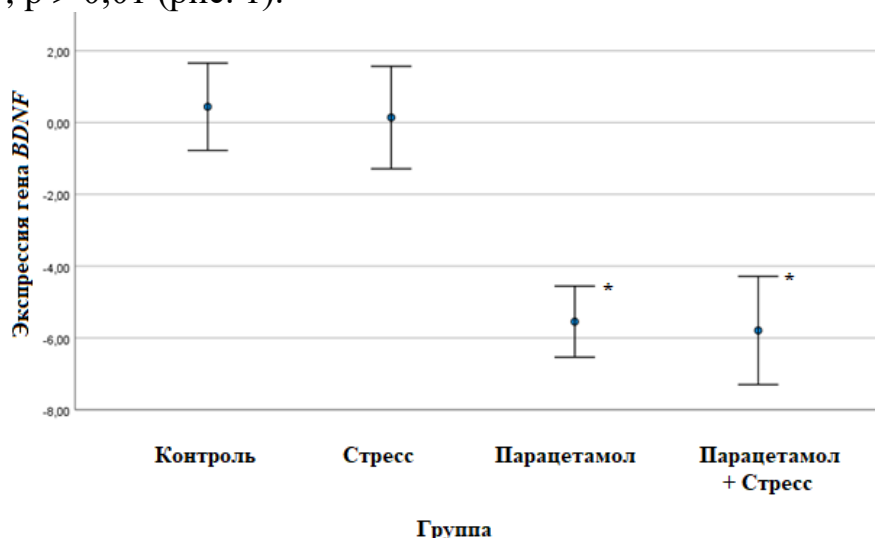


Рис. 1. Экспрессия гена *BDNF* после одного месяца воздействия стресса и парацетамола. \*  $p < 0,05$

Экспрессия исследуемого гена ниже в группах животных, получавших парацетамол по сравнению с группой контроля ( $0,44 \pm 0,54$ ;  $-5,55 \pm 0,43$ ;  $-5,80 \pm 0,65$ ;  $p < 0,01$ ).

О нейротоксическом действии парацетамола и его метаболитов упоминается в работах других авторов [7, 8]. Высокие дозы препарата и его длительное поступление в организм могут провоцировать изменения экспрессии в том числе генов нервной системы.

Также описывается, что стрессовое воздействие может снижать экспрессию нейротрофического фактора и его содержание в центральной нервной системе [9], однако в условиях проведенного эксперимента стресс не оказал влияния, зафиксированного статистически.

Информация о финансировании работы. Исследование проведено в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обоснование национальной системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, управления рисками здоровью и повышения качества жизни населения России» по теме № 6.9.1.2 «Изучение воздействия химического производственного фактора в условиях хронического стресса».

Этические положения (при необходимости). Дата заседания биоэтической комиссии ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» 05.03.2024 г. № 01-03.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Vasenina E.E., Gankina O.A. Chronic stress and asthenia // *General Medicine*. 2023. No. 1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/hronicheskiy-stress-i-asteniya>
2. Kuvandik G., Duru M., Nacar A., Yonden Z., Helvaci R., Koc A., et al. Effects of erdosteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats // *Toxi-col. Pathol*. 2008. 36(5): 714-9. <https://doi.org/10.1177/0192623308320800>
3. Zotov P.B., Lyubov E.B., Abuzarova G.R., Skryabin E.G., Klyashev S.M., Petrov V.G. Paracetamol as a means of suicidal actions in Russia and abroad // *Suicidology*. 2019. No. 4 (37). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/paracetamol-kak-sredstvo-suicidalnyh-deystviy-v-rossii-i-zarubezhom>.
4. Bambico F.R. et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 modulates serotonin-dependent emotional behaviour, and serotonin1A and serotonin2A/C activity in the hippocampus // *European Neuropsychopharmacology*, 2016. Т. 26. № 3. С. 578–590.
5. Matisz C.E., Badenhorst C.A., Gruber A.J. Chronic unpredictable stress shifts rat behavior from exploration to exploitation // *Stress*. 2021. Т. 24. № 5. Р. 635–644.
6. Livak, J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method // *Methods*, 2001. № 25. Pp. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
7. Власова Ю.А., Голованова Н.Э., Бейшебаева Ч.Р., Загородникова К.А., Соколова М.Н., Дадали В.А., Антонова Ж.В. Исследование нейротоксичности парацетамола и его метаболита NAPQI (краткое сообщение) // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021. № 4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-neyrotoksichnosti->

paratsetamola-i-ego-metabolita-napqi-kratkoe-soobschenie (дата обращения: 30.08.2024).

8. Широкова В.О., Гуртьев Д.А., Мокшина М.Н., Малашихина А.В., Ислямов А.Р., Цыздоев М.А., Дудниченко Т.А., Власова Ю.А. Цитотоксическое действие NAPQI // Цитология, 2022. Т. 64. № 7. С. 719–720. Материалы VIII молодежной школы-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН (11–14 октября 2022 г., Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

9. Peregud D.I., Freiman S.V., Tishkina A.O., Sokhranyaeva L.S., Lazareva N.A., Onufriev M.V., Stepanichev M.Y., Gulyaeva N.V. Effects of early neonatal proinflammatory stress on the expression of *BDNF* transcripts in the brain regions of prepubertal male rats // Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2016. 20(2). Pp. 191–197. DOI 10.18699/VJ16.149.

© Гизатуллина А.А., Валова Я.В., Каримов Д.О., 2024

УДК: 577.2;616.21;615.357

## **ИНСУЛИН-ЗАВИСИМЫЕ ЦЕНТРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГЛЮКОЗНОГО ГОМЕОСТАЗА**

Деркач К.В.\* , Шпаков А.О.

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

\*derkatch\_k@list.ru

Общепринято, что регуляция глюкозного гомеостаза осуществляется инсулином, циркулирующим в кровотоке, который непосредственно воздействует на ткани-мишени и контролирует захват ими глюкозы, ее метаболизм и продукцию *de novo*. Однако в последние годы отчетливо продемонстрировано, что не менее важную роль в контроле глюкозного гомеостаза и, прежде всего, в регуляции глюконеогенеза играет инсулин мозга. Свои эффекты на периферический обмен глюкозы инсулин мозга оказывает путем воздействия на гипоталамические нейроны, в первую очередь на нейроны аркуатного ядра гипоталамуса, экспрессирующие про-опиомеланокортин, прекурсор меланокортиновых пептидов, или агути-подобный пептид и нейропептид Y. Важную роль в глюкозорегуляторном действии инсулина мозга играет взаимодействие гипоталамической инсулиновой системы с другими системами, регулируемые лептином, меланокортинами, моноаминами. Функциональные изменения в опосредуемой инсулином мозга регуляции глюкозного гомеостаза, в том числе возникающие при нейродегенеративных заболеваниях, могут стать первопричиной метаболических расстройств, вызывая нарушение толерантности к глюкозе и инсулиновую резистентность на периферии.

Вследствие этого использование фармакологических агентов для восстановления функциональной активности инсулиновой системы мозга представляет собой один из многообещающих подходов для лечения сахарного диабета, метаболического синдрома и ожирения, а также для предотвращения метаболических дисфункций при нейродегенеративных заболеваниях. Наибольший интерес здесь представляет применение интраназально вводимого инсулина, непосредственно поступающего к структурам мозга, а также использование усилителей инсулинового сигналинга (лептин, ингибиторы тирозиновых фосфатаз, С-пептид проинсулина, метформин, антиоксиданты), в том числе в комбинации с интраназально вводимым инсулином.

**Ключевые слова:** инсулин мозга, глюкозный гомеостаз, интраназально вводимый инсулин, гипоталамус, нейродегенерация

## **INSULIN-DEPENDENT CENTRAL MECHANISMS REGULATING GLUCOSE HOMEOSTASIS**

Derkach K.V.\* , Shpakov A.O.

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

\* derkatch\_k@list.ru

It is generally accepted that the regulation of glucose homeostasis is carried out by insulin circulating in the bloodstream, which directly acts on target tissues and controls their uptake of glucose, its metabolism and de novo production. However, in recent years it has been clearly demonstrated that brain insulin also plays an important role in the control of glucose homeostasis and, first of all, in the regulation of gluconeogenesis. Brain insulin exerts its effects on peripheral glucose metabolism by acting on hypothalamic neurons, primarily on neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus, expressing pro-opiomelanocortin, a precursor of melanocortin peptides, or agouti-like peptide and neuropeptide Y. An important role in the glucose regulatory action of brain insulin is played by the interaction of the hypothalamic insulin system with other systems regulated by leptin, melanocortins, and monoamines. Functional changes in brain insulin-mediated regulation of glucose homeostasis, including those occurring in neurodegenerative diseases, may become the underlying cause of metabolic disorders, causing impaired glucose tolerance and insulin resistance in the periphery. As a result, the use of pharmacological agents to restore the functional activity of the brain insulin system represents one of the promising approaches for the treatment of diabetes mellitus, metabolic syndrome and obesity, as well as for the prevention of metabolic dysfunctions in neurodegenerative diseases. Of greatest interest here is the use of intranasally administered insulin, which directly enters the brain structures, as well as the use of insulin signaling enhancers (leptin, tyrosine phosphatase inhibitors, proinsulin C-peptide, metformin, antioxidants), including in combination with intranasally administered insulin.

**Keywords:** brain insulin, glucose homeostasis, intranasally administered insulin, hypothalamus, neurodegeneration

Уже через два десятилетия после открытия секретируемого поджелудочной железой инсулина Ф. Бантингом и Ч. Бестом и установлением его роли в регуляции глюкозного гомеостаза начали предприниматься попытки идентифицировать этот гормон в других органах и тканях, включая мозг, а также выяснить, ограничены ли функции инсулина у человека и животных исключительно контролем энергетического обмена. Длительное время эти исследования не приносили значимых результатов, но уже в последней четверти XX века ситуация кардинально изменилась. Было показано, что инсулин присутствует в мозге большинства позвоночных животных (млекопитающие, птицы, рыбы), а в нейронах и глиальных клетках имеются все основные компоненты инсулиновой сигнальной системы, включая инсулиновый рецептор и белки, субстраты инсулинового рецептора (IRS-белки). Появились даже сведения, что в развивающемся мозге млекопитающих может осуществляться синтез инсулина. В пользу такой возможности свидетельствовали многочисленные данные о том, что инсулин и родственные ему пептиды могут синтезироваться в нервных ганглиях некоторых беспозвоночных (моллюски, насекомые, круглые черви). Было показано, что у позвоночных животных инсулин (либо поступающий в нервную ткань извне, либо синтезируемый непосредственно в нервной системе) вовлечен в регуляцию нейрогенеза, нейродифференцировки и синаптической пластичности, определяя, тем самым, формирование мозга в онтогенезе, контролируя когнитивные функции. На рубеже XX–XXI веков появились многочисленные свидетельства того, что функциональные нарушения инсулиновых сигнальных путей в мозге являются одними из первопричин многих нейродегенеративных заболеваний, в первую очередь болезни Альцгеймера, а также диабетической энцефалопатии, возникающей либо в условиях инсулинового дефицита, характерного для сахарного диабета (СД) 1 типа, либо в условиях системной инсулиновой резистентности, характерной для СД 2 типа и метаболического синдрома [1]. Кроме того, было показано, что инсулиновая сигнальная система, находясь в тесном взаимодействии с другими сигнальными системами мозга, через центральные механизмы осуществляет контроль метаболических процессов в печени и жировой ткани, оказывает модулирующее влияние на эндокринную и сердечно-сосудистую систему. Тем самым, ключевая роль инсулина мозга в функционировании ЦНС и регуляции множества физиологических процессов была доказана. При этом долгое время открытым оставался вопрос о вкладе инсулина мозга в регуляцию глюкозного гомеостаза, тем более что традиционно ключевую роль здесь отводили панкреатическому инсулину, глюкозорегуляторное действие которого осуществляется в основном через периферические механизмы. В последние годы и в этом направлении достигнут значительный прогресс, чему способствовали идентификация отделов мозга, вовлеченных

в регуляцию глюкозного гомеостаза, а также путей, связывающих глюкоза-регулирующие системы мозга и системы, контролирующие углеводный обмен на периферии. Не менее важную роль сыграло и определение паттерна других регуляторов глюкозного гомеостаза, действующих, в том числе, через центральные механизмы, сигнальные пути которых функционально связаны с инсулиновыми путями.

Установлено, что в процесс регуляции периферического метаболизма глюкозы и ее уровня в крови вовлечены как гипоталамические, так и внегипоталамические структуры. Среди отделов гипоталамуса в этом отношении наиболее важны аркуатные ядра (ARC), вентромедиальный гипоталамус (VMH) и латеральный гипоталамус (LHA) [2]. В то время как среди внегипоталамических структур необходимо выделить область миндалевидного тела (ядро ложа терминальной полоски), структуры продолговатого мозга (дорсальный вагусный комплекс, бледное ядро шва), вегетативные, парасимпатические и симпатические преганглионарные нейроны ствола мозга, а также сенсорные и интегративные кластеры заднего мозга. При этом основную функциональную нагрузку в мониторинге уровня глюкозы в крови и в регуляции ее метаболизма играют нейроны аркуатного ядра гипоталамуса, в первую очередь те из них, которые экспрессируют  $\alpha$ -меланоцитстимулирующий гормон и другие меланокортины, производные про-опиомеланокортина (POMC), и их функциональные антагонисты – агути-подобный пептид (AgRP) и нейропептид Y (NPY). POMC- и AgRP/NPY-экспрессирующие нейроны аркуатного ядра и секретируемые ими нейропептиды непосредственно влияют на активность инсулиновой системы мозга и опосредуют эффекты инсулина мозга на пищевое поведение, энергетический обмен и периферический глюкозный гомеостаз.

Первые сообщения о том, что инсулина мозга способен ингибировать продукцию глюкозы на периферии были получены еще двадцать лет назад в экспериментах по влиянию введенного в гипоталамическую область инсулина на глюконеогенез в печени и уровень глюкозы в крови. Расшифровка механизмов центрального гипогликемического эффекта инсулина показала, что он воздействует на инсулиновые рецепторы, локализованные на поверхности AgRP/NPY-экспрессирующих нейронов, поскольку ингибиторы инсулиновых сигнальных путей в этих нейронах повышали продукцию глюкозы гепатоцитами и приводили к умеренной гипергликемии, в то время как активация инсулинового сигналинга вызывала противоположный эффект [3]. Молекулярной основой эффекта инсулина была способность гормона через сигнальный путь инсулиновый рецептор–IRS-белок–фосфатидилинозитол-3-киназа вызывать гиперполяризацию AgRP/NPY-экспрессирующих нейронов и снижать частоту их возбуждения посредством открытия АТФ-чувствительных калиевых каналов. Результатом этого является опосредуемая интерлейкином-6 стимуляция активности зависимых от транскрипционного фактора STAT3 сигнальных путей в гепатоцитах, следствием чего является

ослабление экспрессии генов глюконеогенеза и снижение уровня глюкозы. Ингибирование активности 3-фосфоинозитидных путей в гипоталамических нейронах ослабляет гипогликемические эффекты инсулина мозга, в то время как активация этих путей приводит к значительному снижению продукции глюкозы печенью. При ожирении, метаболическом синдроме и СД 2 типа инсулиновые сигнальные пути в AgRP/NPY-экспрессирующих нейронах ослабевают, и это является одним из пусковых механизмов нарушения глюкозного гомеостаза и развития непереносимости глюкозы [2].

При активации инсулином POMC-экспрессирующих нейронов глюконеогенез в печени, напротив, усиливается, что приводит к нарушению глюкозного гомеостаза. Так у мышей при селективном повышении экспрессии инсулиновых рецепторов в этих нейронах отмечается повышение продукции глюкозы гепатоцитами и усугубление инсулиновой резистентности, в то время как активация в POMC-экспрессирующих нейронах протеинкиназы p70S6K, являющейся негативным регулятором инсулинового сигналинга, предотвращает эти негативные эффекты инсулина [4]. Это указывает на функциональную дихотомию в инсулиновой регуляции обмена глюкозы в печени, которая реализуется через AgRP/NPY- и POMC-экспрессирующие нейроны. В этой связи необходимо отметить, что инсулин, воздействуя на POMC-экспрессирующие нейроны и вызывая секрецию ими меланокортиновых пептидов, способен снижать уровень глюкозы в крови вследствие снижения аппетита и усиления расхода энергии, но действие инсулина в этом случае является опосредованным, будучи реализовано через меланокортиновые сигнальные механизмы [5].

Гипоталамические механизмы лежат в основе подавления инсулином мозга расщепления липидов и стимуляции синтеза жирных кислот и триглицеридов в адипоцитах, что обуславливает снижение симпатического тонуса белой жировой ткани. В свою очередь, изменения липидного обмена опосредуют изменения глюконеогенеза. Вызываемое инсулином мозга ингибирование процесса липолиза приводит к дефициту глицерина и неэстерифицированных жирных кислот, которые являются субстратами для синтеза глюкозы в гепатоцитах. Тем самым, подавление липолиза является еще одним механизмом центральной регуляции инсулином уровня периферической глюкозы.

Одним из подходов для восстановления функциональной активности инсулиновой системы в гипоталамусе и других отделах мозга в условиях дефицита инсулина в мозге или развития центральной инсулиновой резистентности является применение интраназально вводимого инсулина (ИВИ). Важно, что в этом случае инсулин поступает в структуры мозга непосредственно по аксональным путям, минуя гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), целостность и транспортные свойства которого в условиях метаболических расстройств, в том числе при СД 2 типа, нарушаются [1]. Так нами показано, что уровни инсулина в гипоталамусе грызунов

с экспериментальными моделями ожирения и СД 2 типа снижены, несмотря на отчетливо выраженную гиперинсулинемию в системном кровотоке [6, 7].

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что ИВИ, который в клинике широко применяется для лечения болезни Альцгеймера и мягкого когнитивного дефицита, а также для предотвращения выраженной диабетической энцефалопатии, также способен влиять на широкий спектр метаболических и гормональных показателей, в том числе нормализовать инсулиновую чувствительность и повышать скорость утилизации глюкозы [8]. Это приводит к снижению уровня глюкозы в крови, однако не вызывает гипогликемических эпизодов, что выгодно отличает ИВИ от инъекционных форм гормона. Необходимо отметить, что гипогликемические эффекты ИВИ при СД 2 типа и ожирении, в условиях системной инсулиновой резистентности, усиления воспаления и окислительного стресса, могут быть ослаблены [9, 10]. Это обусловлено как функциональными нарушениями в инсулиновой системе мозга, препятствующими нормальному прохождению инсулинового сигнала по нейрональным сетям, что является следствием активации процессов нейровоспаления, гиперпродукцией активных форм кислорода, усилением стресса эндоплазматического ретикулума, так и нарушением функционального взаимодействия между инсулиновой и другими сигнальными системами мозга, такими как лептиновая, дофаминовая и меланокортиновая [11, 12]. Для повышения эффективности ИВИ в условиях центральной инсулиновой резистентности необходимо оптимизировать стратегию применения препарата (дозы, частота введения, продолжительность лечения), Эффективным может оказаться и совместное применение ИВИ с препаратами, повышающими чувствительность тканей к инсулину (метформин, ингибиторы тирозиновых фосфатаз, в первую очередь протеинфосфотирозинфосфатазы 1В), с антиоксидантами (ганглиозиды мозга, альфа-токоферол), а также с гормональными агентами, потенцирующие инсулиновый сигналинг в ЦНС (лептин и его активные фрагменты, агонисты дофаминового рецептора 2 типа). Значительный интерес представляет и совместное применение ИВИ с интраназально вводимым С-пептидом проинсулина, который стабилизирует функционально активную форму гормона и, наряду с этим, будучи наделен собственными сигнальными функциями, потенцирует некоторые эффекты инсулина, например, стимуляцию им фосфатидилинозитол-3-киназы. В пользу усиления эффектов ИВИ в присутствии таких агентов свидетельствуют наши данные по использованию ИВИ в комбинациях с метформином, D2-агонистом бромкриптином, С-пептидом проинсулина, ингибиторами фосфатаз и ганглиозидами для коррекции метаболических и гормональных нарушений у крыс с СД 2 типа и ожирением [1]. Это было обусловлено нормализацией пищевого поведения и массы тела, снижением инсулиновой резистентности, подавлением глюконеогенеза в печени, а также восстановлением липидного обмена.



Таким образом, инсулин мозга не только влияет на функциональные характеристики нейронов, но через центральные механизмы контролирует метаболизм глюкозы на периферии, внося значимый вклад в поддержание системного глюкозного гомеостаза. Ключевую роль в этих эффектах играют гипоталамические нейроны, экспрессирующие POMC, AgRP и NPY и являющиеся основными мишенями инсулина в мозге. Значительный вклад вносит и взаимодействие инсулиновой системы в этих нейронах с другими сигнальными системами, в первую очередь с лептиновой. Ослабление инсулин-опосредуемой центральной регуляции глюкозного гомеостаза на ранних стадиях метаболических заболеваний является одним из факторов развития нарушенной толерантности к глюкозе и гипергликемии. В дальнейшем это приводит к усугублению и генерализации метаболических и гормональных нарушений. Использование фармакологических агентов, способных восстанавливать активность инсулиновой системы мозга, представляет собой перспективный подход для коррекции СД, метаболического синдрома, ожирения и их осложнений, а также для предотвращения метаболических дисфункций при нейродегенеративных заболеваниях, для которых характерно ослабление центральной инсулиновой сигнализации. Здесь наибольший интерес представляют ИВИ и усилители инсулинового сигналинга – лептин и его аналоги, ингибиторы тирозиновых фосфатаз, С-пептид проинсулина, а также метформин и некоторые антиоксиданты, причем наиболее перспективным является их комбинированное применение.

Работа поддержана Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2022-296, на создание и развитие научного центра мирового уровня «Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Shpakov A.O., Zorina I.I., Derkach K.V. Hot Spots for the Use of Intranasal Insulin: Cerebral Ischemia, Brain Injury, Diabetes Mellitus, Endocrine Disorders and Postoperative Delirium // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. No. 4. Pp. 3278.
2. Ruud J., Steculorum S.M., Brüning J. C. Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism // Nature Communications, 2017. Vol. 8. P. 15259.
3. Obici S., Zhang B.B., Karkanias G., Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production // Nature Medicine. 2002. Vol. 8. No. 12. Pp. 1376–1382.

4. Smith M.A., Katsouri L., Irvine E.E., Hankir M.K., Pedroni S.M., Voshol P.J., Gordon M.W., Choudhury A.I., Woods A., Vidal-Puig A. et al. Ribosomal S6K1 in POMC and AgRP Neurons Regulates Glucose Homeostasis but Not Feeding Behavior in Mice // *Cell Reports*. 2015. Vol. 11. No. 3. Pp. 335–343.
5. Yang D., Hou X., Yang G., Li M., Zhang J., Han M., Zhang Y., Liu Y. Effects of the POMC System on Glucose Homeostasis and Potential Therapeutic Targets for Obesity and Diabetes // *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2022. Vol. 15. Pp. 2939–2950.
6. Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O. The Leptin, Dopamine and Serotonin Receptors in Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents // *Neurochemical Research*. 2018. Vol. 43. No. 4. Pp. 821–837.
7. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect // *PLoS One*. 2019. Vol. 14. No. 3. P. e0213779.
8. Heni M., Wagner R., Kullmann S., Gancheva S., Roden M., Peter A., Stefan N., Preissl H., Häring H.U., Fritsche A. Hypothalamic and Striatal Insulin Action Suppresses Endogenous Glucose Production and May Stimulate Glucose Uptake During Hyperinsulinemia in Lean but Not in Overweight Men // *Diabetes*. 2017. Vol. 66. No. 7. Pp. 1797–1806.
9. Kullmann S., Kleinridders A., Small D.M., Fritsche A., Häring H.U., Preissl H., Heni M. Central nervous pathways of insulin action in the control of metabolism and food intake // *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020. Vol. 8. No. 6. Pp. 524–534.
10. Heni M. The insulin resistant brain: impact on whole-body metabolism and body fat distribution // *Diabetologia*. 2024. doi: 10.1007/s00125-024-06104-9.
11. Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M. Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases // *Future Science OA*. 2015. Vol. 1. No. 3. P. FSO25.
12. Masliukov P.M. Changes of Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons with Aging // *Current Issues in Molecular Biology*. 2023. Vol. 45. No. 10. Pp. 8289–8308.

© Деркач К.В., Шпаков А.О., 2024.

**ВЛИЯНИЕ D2-АГОНИСТА БРОМОКРИПТИНА,  
В ТОМ ЧИСЛЕ В КОМБИНАЦИИ С МЕТФОРМИНОМ,  
НА ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЕ СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ  
У САМЦОВ КРЫС С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ,  
ВЫЗВАННЫМ ОГРАНИЧЕНИЕМ ГРУДНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ**

Деркач К.В. \*, Зорина И.И., Шпаков А.О.

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

\* derkatch\_k@list.ru

Одной из причин метаболического синдрома (МС) является нарушение грудного вскармливания в постнатальный период развития. Однако патогенез неонатально запрограммированного метаболического синдрома (НЗМС) и пути его коррекции мало изучены. Для лечения МС используют D2-агонист бромокриптин, но его эффективность при НЗМС, в том числе в комбинации с метформином, не изучена. Цель работы состояла в изучении влияния бромокриптина и его комбинации с метформином на нарушенные у девятимесечных самцов крыс с НЗМС метаболические и гормональные показатели и на экспрессию у них гипоталамических генов, вовлеченных в регуляцию аппетита, метаболизма и инсулиновой чувствительности. Бромокриптин восстанавливал инсулиновую и лептиновую чувствительность у крыс с НЗМС, нормализовал толерантность к глюкозе, снижал массу жировой ткани, и эти эффекты усиливались при его совместном введении с метформином. При комбинированной терапии в гипоталамусе восстанавливалась экспрессия генов, ответственных за аппетит и передачу инсулинового и лептинового сигналов. Тем самым, бромокриптин и его комбинация с метформином могут рассматриваться как перспективный подход для коррекции негативных проявлений НЗМС.

**Ключевые слова:** гипоталамус, метформин, бромокриптин, метаболический синдром, грудное вскармливание

**EFFECT OF THE D2-AGONIST BROMOCRIPTINE, INCLUDING  
IN COMBINATION WITH METFORMIN, ON HYPOTHALAMIC  
SIGNALING SYSTEMS IN MALE RATS WITH METABOLIC  
SYNDROME CAUSED BY RESTRICTION OF BREASTFEEDING**

Derkach K.V. \*, Zorina I.I., Shpakov A.O.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian  
Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia.

\* derkatch\_k@list.ru

One of the causes of metabolic syndrome (MS) is impaired breastfeeding during the postnatal period of development. However, the pathogenesis of

neonatally programmed metabolic syndrome (NPMS) and ways of its correction have been poorly studied. The D2 agonist bromocriptine is used to treat MS, but its effectiveness in NPMS, including in combination with metformin, has not been studied. The purpose of the work was to study the effect of bromocriptine and its combination with metformin on impaired metabolic and hormonal parameters in nine-month-old male rats with NPMS and on the expression of hypothalamic genes involved in the regulation of appetite, metabolism and insulin sensitivity. Bromocriptine restored insulin and leptin sensitivity in rats with NPMS, normalized glucose tolerance, and reduced adipose tissue mass, and these effects were enhanced when co-administered with metformin. With combination therapy, the expression of genes responsible for appetite and the transduction of insulin and leptin signals was restored in the hypothalamus. Thus, bromocriptine and its combination with metformin can be considered as a promising approach for correcting the negative manifestations of NPMS.

**Keywords:** hypothalamus, metformin, bromocriptine, metabolic syndrome, breastfeeding

### **Актуальность**

Прерывание или ограничение грудного вскармливания приводит к нарушениям метаболического и гормонального статуса во взрослом возрасте, что характеризуют как неонатально запрограммированный метаболический синдром (НЗМС). Одним из патогенетических факторов при различных формах МС являются нарушения гипоталамической регуляции пищевого поведения и метаболизма, в том числе дисфункции в дофаминовой, инсулиновой и лептиновой системах гипоталамуса [1]. Эффективных подходов для коррекции НЗМС в настоящее время не разработано, в связи с чем актуальной остается задача поиска фармакологических агентов, которые могли бы ослабить или предотвратить нарушения, вызываемые неонатальным голоданием. Среди таких агентов значительный интерес представляют бромокриптин (БК), агонист D2-дофаминовых рецепторов (D2-ДАР), и антидиабетический препарат метформин (МФ). Воздействуя на дофаминергическую систему мозга, в том числе на центры, контролирующие пищевое поведение и эффекты вознаграждения, БК улучшает центральную регуляцию периферического метаболизма, что делает его перспективным препаратом для лечения сахарного диабета 2 типа и других метаболических расстройств [2, 3]. МФ нормализует инсулиновую чувствительность и углеводный и липидный обмен на периферии, но его действие распространяется и на мозг, где он через гипоталамические механизмы нормализует пищевое поведение и энергетический обмен [4, 5]. Цель работы состояла в изучении влияния БК и его комбинации с МФ на метаболические и гормональные показатели и на экспрессию гипоталамических генов, вовлеченных в регуляции метаболизма, аппетита и инсулиновой чувствительности, у взрослых самцов крыс с НЗМС.

## Материалы и методы

В опытах использовали самцов крыс Wistar, получавших стандартную диету и воду ad libitum. Для индукции НЗМС крысят в течение 3 дней (P19–P21) лишали грудного вскармливания, для чего кормящим самкам давали бромкриптин («Gedeon Richter, Plc.», Венгрия) в дозе 10 мг/крысу/сутки. На 22-й день после рождения крысят переводили на стандартный сухой корм. При достижении возраста 9 месяцев у крыс оценивали массу тела и чувствительность к глюкозе, используя глюкозотолерантный тест (ГТТ) с введением глюкозы (в/б, 2 г/кг). Отбирали животных с признаками НЗМС (масса тела повышена не менее чем на 10% и значения  $AUC_{0-120}$  для глюкозных кривых в ГТТ не менее чем на 20% от таковых в контроле). Затем крыс с НЗМС делили на группы (в каждой по 6) и в течение 3 недель лечили БК (0.3 мг/кг/сутки, перорально, группа «БК»), МФ (120 мг/кг/сутки, перорально, «МФ») и совместно БК и МФ в тех же дозах («БКМФ»). Контрольной («К») и экспериментальной («НЗМС») группам вместо препаратов давали физиологический раствор. В конце эксперимента оценивали массу тела и жира, повторно проводили ГТТ, оценивая уровни глюкозы в течение 120 мин и уровни инсулина и лептина до и через 120 мин после нагрузки глюкозой. Уровень глюкозы измеряли с помощью тест-полосок «One Touch Select» (США), уровни инсулина и лептина – с помощью наборов «Rat Insulin ELISA» («Mercodia», Швеция) и «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США). Индекс инсулиновой резистентности (ИР) рассчитывали, как произведение концентраций глюкозы и инсулина. Для оценки экспрессии целевых генов в гипоталамусе крыс применяли количественную RT-ПЦР, как описано ранее [6]. Использовали амплификатор «7500 Real-Time PCR System» («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), в качестве генов домашнего хозяйства – гены 18S-рРНК (18S rRNA) и  $\beta$ -актина (*Actb*). Для расчета использовали метод  $\Delta\Delta C_t$ , значения RQ рассчитывали, принимая экспрессию целевого гена в контроле за единицу. Статистический анализ данных проводили, используя программу «Microsoft Office Excel 2007», результаты представляли, как  $M \pm SEM$ . Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро-Уилка. Для сравнения 2 выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения 3 и более выборок – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при  $p < 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

В группе «НЗМС» отмечали повышение массы тела и жировой ткани (суммарно абдоминального и эпидидимального жира), нарушенную толерантность к глюкозе (повышение значения  $AUC_{0-120}$  и уровня глюкозы через 120 мин после нагрузки), повышение базового и стимулированного глюкозой уровня лептина и стимулированного глюкозой уровня инсулина, а также индекса ИР (табл. 1). После лечения БК отмечали улучшение толерантности к глюкозе и чувствительности к инсулину, снижение стимулированных глюкозой уровней инсулина и лептина. Лечение МФ

в выбранной сравнительно низкой дозе снижало массу жира, ослабляло ИР и частично восстанавливало чувствительность к глюкозе и инсулину (табл. 1).

Таблица 1.

Масса тела и жировой ткани, АUC<sub>0-120</sub> для глюкозной кривой, уровни лептина и инсулина до и через 120 мин после глюкозной нагрузки у 9-месячных самцов крыс с НЗМС, и влияние на эти показатели лечения БК и МФ отдельно и совместно

Показатель	«К»	«НЗМС»	«БК»	«МФ»	«БКМФ»
Масса тела, г	387 ± 9	457 ± 10 <sup>a</sup>	462 ± 12 <sup>a</sup>	428 ± 17	403 ± 9 <sup>b</sup>
Масса жира, г	7.0 ± 0.9	19.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	19.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	12.3 ± 1.0 <sup>ab</sup>	10.1 ± 1.2 <sup>b</sup>
AUC <sub>0-120</sub> , усл.ед.	1107±28	1615±42 <sup>a</sup>	1332±31 <sup>ab</sup>	1306±20 <sup>ab</sup>	1197±29 <sup>b</sup>
Глюкоза-0, мМ	4.0±0.2	4.6±0.3	4.5±0.2	4.1±0.2	3.9±0.2
Глюкоза-120, мМ	4.3±0.2	6.1±0.4 <sup>a</sup>	5.0±0.4	4.9±0.5	4.4±0.2 <sup>b</sup>
Инсулин-0, нг/мл	0.67±0.12	0.73±0.13	0.79±0.11	0.62±0.15	0.61±0.10
Инсулин-120, нг/мл	0.80±0.06	1.63±0.21 <sup>a</sup>	1.34±0.11 <sup>a</sup>	1.11±0.17	0.89±0.11 <sup>b</sup>
Лептин-0, нг/мл	1.27±0.16	2.26±0.24 <sup>a</sup>	1.84±0.26	1.93±0.22	1.39±0.11 <sup>b</sup>
Лептин-120, нг/мл	1.56±0.20	3.68±0.31 <sup>a</sup>	2.02±0.12 <sup>b</sup>	2.97±0.23 <sup>a</sup>	1.43±0.18 <sup>b</sup>
Индекс ИР-120, усл.ед.	3.36±0.14	9.78±0.48 <sup>a</sup>	6.51±0.40 <sup>ab</sup>	5.53±0.60 <sup>ab</sup>	4.02±0.33 <sup>b</sup>

Примечание. Во всех группах  $n = 6$ , данные представлены как  $M \pm SEM$ . Различия с контролем (<sup>a</sup>) и с НЗМС (<sup>b</sup>) статистически значимы при  $p < 0.05$ .

При совместном применении БК и МФ эффективность терапии по ряду показателей была выше, чем при монотерапии. Так в группе «БКМФ» отмечали снижение массы тела и базального уровня лептина и более выраженное снижение в сравнении с группой «НЗМС» значения АUC<sub>0-120</sub> для глюкозной кривой (табл. 1). Тем самым, комбинированное применение препаратов позволяет достичь более выраженного эффекта при восстановлении метаболических и гормональных показателей, используя сравнительно низкую дозу МФ, которая не вызывает характерных для его высокой дозы нежелательных эффектов (лактоацидоз, дисфункции желудочно-кишечного тракта).

Для выяснения причин различий в эффектах БК и МФ и их усиления при совместном введении изучали экспрессию гипоталамических генов, кодирующих регуляторы пищевого поведения, энергетического обмена и эндокринных функций. При НЗМС снижалась экспрессия генов МС4-меланокортинового (*Mc4r*) и лептинового (*Lep<sup>r</sup>*) рецепторов, ответственных за передачу анорексигенных сигналов, и D2-ДАР (*D2r*), вовлеченного в эффекты вознаграждения и центральную регуляцию инсулиновой чувствительности. Отмечали тенденцию к повышению экспрессии гена фосфотирозинфосфатазы 1В (*Ptr1b*), негативного регулятора инсулинового и лептинового сигналинга. Экспрессия орексигенных генов нейропептида Y (*Npy*) и агути подобного пептида (*Ag<sup>r</sup>p*) не менялась, экспрессия гена

проопиомеланокортина (*Pomc*), прекурсора анорексигенных меланокортиновых пептидов повышалась, что является компенсаторной реакцией на снижение экспрессии *Mc4r*. Не было изменений экспрессии гена инсулинового рецептора (*Insr*) и D1-ДАР (*D1r*) (табл. 2).

Таблица 2.

Экспрессия генов в гипоталамусе 9-месячных самцов крыс с НЗМС, влияние лечения БК и МФ (представлены значения RQ)

Показатель	Контроль	НЗМС	БК	МФ	БКМФ
<i>Insr</i>	1.02±0.08	1.19±0.12	1.11±0.14	0.52±0.05 <sup>аб</sup>	0.78±0.12
<i>Lep<sup>r</sup></i>	1.03±0.04	0.60±0.07 <sup>а</sup>	0.97±0.11	1.08±0.09 <sup>б</sup>	0.88±0.09
<i>Mc4r</i>	0.99±0.08	0.41±0.05 <sup>а</sup>	0.53±0.03 <sup>а</sup>	0.62±0.14	0.94±0.07 <sup>б</sup>
<i>D1r</i>	1.01±0.02	0.97±0.12	1.19±0.09	0.85±0.13	0.81±0.10
<i>D2r</i>	1.02±0.08	0.55±0.06 <sup>а</sup>	0.37±0.11 <sup>а</sup>	0.90±0.04 <sup>б</sup>	0.72±0.12
<i>Ptp1b</i>	1.00±0.09	1.64±0.21	1.07±0.08	0.84±0.15	0.49±0.08 <sup>б</sup>
<i>Pomc</i>	1.03±0.10	1.89±0.08 <sup>а</sup>	3.08±0.26 <sup>аб</sup>	1.72±0.29	2.18±0.19 <sup>а</sup>
<i>Npy</i>	1.03±0.06	1.26±0.09	0.92±0.11	0.63±0.06 <sup>аб</sup>	0.39±0.10 <sup>аб</sup>
<i>Agrp</i>	1.01±0.10	1.12±0.02	1.56±0.08 <sup>а</sup>	0.99±0.11	1.22±0.08

Примечание. Во всех группах  $n = 6$ , данные представлены как  $M \pm SEM$ . Различия с контролем (<sup>а</sup>) и с НЗМС (<sup>б</sup>) статистически значимы при  $p < 0.05$ .

Лечение БК в еще большей степени повышало экспрессию *Pomc*, но также повышало экспрессию *Agrp*, антагониста меланокортиновых пептидов. Наряду с этим отмечали нормализацию экспрессии *Ptp1b* и *Lep<sup>r</sup>*, что указывает на восстановление инсулинового и лептинового сигналинга в гипоталамусе крыс группы «БК» (табл. 2). В еще большей степени снижалась экспрессия гена D2-ДАР, как результат его гиперактивации БК. В группе «МФ» нормализовалась экспрессия *Lep<sup>r</sup>* и *Ptp1b*, но довольно неожиданно снижалась экспрессия *Insr*, что можно рассматривать как ответ на усиление эффективности инсулинового сигнала в мозге в условиях МФ терапии. Отмечали снижение экспрессии *Npy* при сохранении повышенной экспрессии *Pomc*, что согласуется с анорексигенным влиянием МФ. При совместном введении отмечали повышение экспрессии *Pomc* при значительном снижении экспрессии *Npy*, повышение в сравнении с группой «НЗМС» экспрессии *Mc4r*, а также снижение ниже контрольного уровня экспрессии *Ptp1b*, что указывает на усиление инсулинового и лептинового сигналинга. Эти изменения могут лежать в основе обнаруженных нами нормализации массы тела и жировой ткани и улучшения метаболических и гормональных показателей при совместном введении БК и МФ. В группе «БКМФ» не отмечали столь выраженного снижения экспрессии *D2r*, как в группе «БК», и соотношение *D2r/D1r* было сходным с таковым в контроле.

Таким образом, БК восстанавливает инсулиновую и лептиновую чувствительность у самцов крыс с НЗМС, снижает у них массу жировой ткани, и его эффекты усиливаются при комбинированном применении со сравнительно низкой дозой МФ. При комбинированной терапии, в отличие от монотерапии, снижается масса тела и нормализуется толерантность

к глюкозе. В гипоталамусе восстанавливается экспрессия генов, ответственных за аппетит и передачу инсулинового и лептинового сигналов. Тем самым, применение БК и его комбинации с МФ может рассматриваться как перспективный подход для коррекции негативных проявлений НЗМС, в том числе опосредуемых нарушением гипоталамических механизмов.

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

Все эксперименты с животными соответствовали рекомендациям биоэтического комитета ИЭФБ РАН и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M. Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases // *Future Sci OA*. 2015. Vol. No. 3. FSO25
2. Mikhail N. Quick-release bromocriptine for treatment of type 2 diabetes // *Curr. Drug Deliv*. 2011. Vol. 8. Pp. 511–516.
3. Garber A.J., Blonde L., Bloomgarden Z.T., Handelsman Y., Dagogo-Jack S. The role of bromocriptine-QR in the management of type 2 diabetes expert panel recommendations // *Endocr. Pract*. 2013. Vol. 19. Pp. 100–106.
4. Chaudhary S., Kulkarni A. Metformin: Past, Present, and Future // *Curr Diab Rep*. 2024. Vol. 24. No. 6. Pp. 119–130.
5. Cao G., Gong T., Du Y., Wang Y., Ge T., Liu J. Mechanism of metformin regulation in central nervous system: Progression and future perspectives // *Biomed Pharmacother*. 2022. Vol. 156. 113686.
6. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect // *PLoS One*. 2019. Vol. 14. NO. 3. E 0213779.

© Деркач К.В., Зорина И.И., Шпаков А.О., 2024



## **АНАЛИЗ СПЕКТРАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ НЕКОТОРЫХ РИТМОВ ЭЭГ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОЧКОВ ВИРТУАЛЬНОЙ РЕАЛЬНОСТИ У СТУДЕНТОВ**

Дурнев Н.А., Кузнецов В.А., Инюшкина Е.М.\*

Самарский национальный исследовательский университет  
им. академика С.П. Королева, г. Самара, Россия

\*inyushkina@mail.ru

Виртуальная реальность (VR) – быстро развивающаяся современная технология, которая имеет широкий спектр применений, начиная от развлекательных игр, и заканчивая образовательными программами. Однако при столь широком применении данной технологии не изучалось ее влияние на спектральную мощность различных ритмов электроэнцефалограммы (ЭЭГ).

Нами было выявлено, что VR-очки оказывают разноплановое воздействие на спектральную мощность  $\alpha$ -ритма, усиливая ее в отведениях P4 и T6, и снижая в отведении O1. Спектральная мощность  $\beta$ -ритма у студентов статистически значимо повышается в затылочной зоне (O1, Oz) и на центральном отведении C3 после использования VR-технологий. На других отведениях спектральная мощность  $\beta$ -ритма имеет динамику к увеличению.

**Ключевые слова:** виртуальная реальность (VR), очки виртуальной реальности (VR-очки), электроэнцефалограмма (ЭЭГ), спектральная мощность, студенты

## **ANALYSIS OF THE SPECTRAL POWER OF SOME EEG RHYTHMS WHEN USING VIRTUAL REALITY GLASSES IN STUDENTS**

Durnev N.A., Kuznetsov V.A., Inyushkina E.M.\*

Samara University, Samara, Russia

\*inyushkina@mail.ru

Virtual reality (VR) is a rapidly developing modern technology that has a wide range of applications, ranging from entertainment games to educational programs. However, with such a wide application of this technology, its effect on the spectral power of various electroencephalogram (EEG) rhythms has not been studied.

We found that VR glasses have a diverse effect on the spectral power of the  $\alpha$ -rhythm, increasing it in leads P4 and T6, and reducing it in lead O1. The spectral power of the  $\beta$ -rhythm in students increases statistically significantly in the occipital zone (O1, Oz) and on the central lead C3 after using VR technologies. On other leads, the spectral power of the  $\beta$ -rhythm tends to increase.

**Keywords:** virtual reality glasses (VR glasses), electroencephalogram, EEG rhythms, spectral power, students

## **Актуальность**

В последние годы виртуальная реальность (VR) стремительно развивается и находит широкое применение в различных областях, таких как образование, медицина, архитектура, развлекательная индустрия и т.д. VR-технологии предоставляют уникальную возможность для создания интерактивных и наглядных учебных и рабочих сред, что способствует повышению эффективности обучения и профессиональной деятельности. В образовательной сфере VR используется для визуализации сложных концепций, проведения виртуальных лабораторных работ и симуляций, что значительно обогащает учебный процесс [3]. Также было выявлено, что виртуальная реальность обеспечивает многоканальное звуковое воспроизведение, которое добавляет аудиальные элементы к визуальным впечатлениям [1].

Однако, несмотря на очевидные преимущества, использование VR вызывает ряд вопросов, связанных с его влиянием на здоровье пользователей. Студенты, как активные пользователи современных технологий, подвержены значительным когнитивным нагрузкам из-за длительного использования компьютеров, смартфонов и других электронных устройств. В условиях растущего использования VR в образовательных учреждениях важно понимать, как эта технология влияет на мозговую активность, в частности на спектральную мощность различных ритмов коры головного мозга.

Цель работы: Изучение влияния виртуальной реальности на спектральную мощность ритмов коры головного мозга.

## **Материалы и методы**

Регистрацию изменений спектральной мощности ритмов электроэнцефалограммы осуществляли на приборе нейровизор NVX 36 digital DCEEG. Регистрация происходила при расположении электродов в соответствии с международной схемой «10–20» в следующих стандартных отведениях: Fp1, Fpz, Fp2, F7, F3, Fz, F4, F8, T3, C3, Cz, C4, T4, T5, P3, Pz, P4, T6, Po3, O1, Oz, O2, Po4. В качестве референтного использовался объединенный ушной электрод. Перед началом записи ЭЭГ на каждый наносился электропроводящий гель для лучшего контакта с кожей головы.

В качестве испытуемых в эксперименте участвовали студенты 20–25 лет. Запись электроэнцефалограммы у каждого человека проводилась дважды – до и после 6 минутной игры в VR-очках. Для достижения максимальной реалистичности, очки VR должны обладать высокой разрешающей способностью, широким углом обзора и минимальной задержкой изображения [4]. В нашем эксперименте были использованы именно такие технологические характеристики. В процессе регистрации ЭЭГ испытуемые располагались в кресле в темной комнате с закрытыми глазами, где принимали удобную позу, сидели с закрытыми глазами, не двигаясь, прибывать в расслабленном состоянии. Запись ЭЭГ длилась 1 минуту.

Вторая запись проводилась также в течение 1 минуты, с теми же требованиями, после проведения тестов.

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием программного пакета «SigmaPlot 12.0». Построение графиков проводили с использованием «Microsoft Excel 2019 MSO (16.0.12527.22250)». Для оценки достоверности изменений спектральной мощности ритмов ЭЭГ у студентов после использования VR-очков относительно исходного уровня использовали «Paired t-test». Нормальность распределения изучаемых параметров определяли с помощью теста «Signed Rank Test». Статистически значимыми считали различия при уровне  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В результате наших исследований было выявлено, что мощность альфа ритма ( $\alpha$ -ритма) увеличивается в отведениях P4 и T6, и уменьшается на O1 (рис.1).

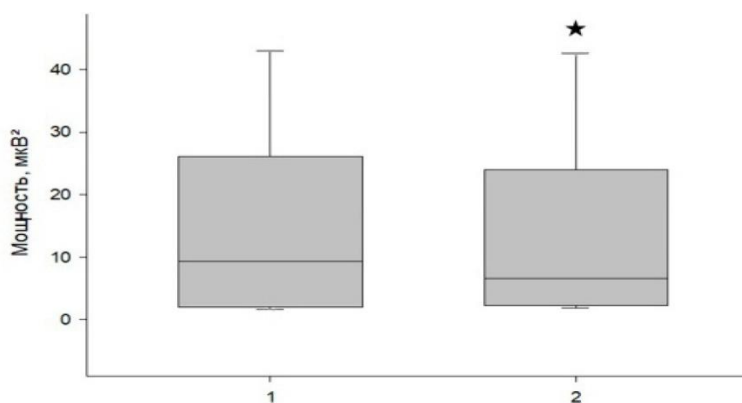


Рис. 1. Изменение спектральной мощности  $\alpha$ -ритма в отведении O1 у студентов до и после использования очков виртуальной реальности:

1 – до использования VR, 2 – после использования VR,  $p \leq 0,05$

Уменьшение же альфа-ритма на O1 также может быть объяснено несколькими факторами. Область O1 отвечает за обработку визуальной информации. Виртуальная реальность существенно нагружает зрительную систему, что может приводить к уменьшению альфа-ритма в этой области. Это снижение может свидетельствовать о продолжающейся активации зрительных зон даже после прекращения использования VR, так как мозг продолжает обрабатывать визуально насыщенные впечатления. Так же, если увеличение  $\alpha$ -ритма на P4 и T6 связано с переходом в более расслабленное состояние, то снижение активности в O1 может быть связано с перераспределением ресурсов мозга. При этом активация других зон может компенсироваться уменьшением активности в области, ответственной за зрительную обработку. Ну и в конечном счете после использования VR мозг может перерабатывать не только визуальные, но и другие сенсорные данные. Снижение  $\alpha$ -ритма в O1 может указывать на временное перераспределение когнитивных ресурсов на другие сенсорные

системы или зоны, отвечающие за интеграцию мультисенсорной информации.

По итогу, изменения в альфа-ритме могут отражать сложный и многогранный процесс адаптации и восстановления мозга после интенсивного сенсорного и когнитивного опыта, связанного с использованием виртуальной реальности [2]. Влияние на память в данном контексте играет ключевую роль, так как альфа-ритмы способствуют консолидации и закреплению новой информации, полученной в процессе взаимодействия с виртуальной средой.

В настоящее время бета-ритмы ассоциируются с когнитивной активностью, концентрацией и вниманием.

В экспериментах нами было выявлено увеличение бета – ритма ( $\beta$  – ритма) в отведении СЗ и в затылочных отведениях (O1, Oz). Последний факт может свидетельствовать о повышенной активности зрительных областей мозга (рис.2).

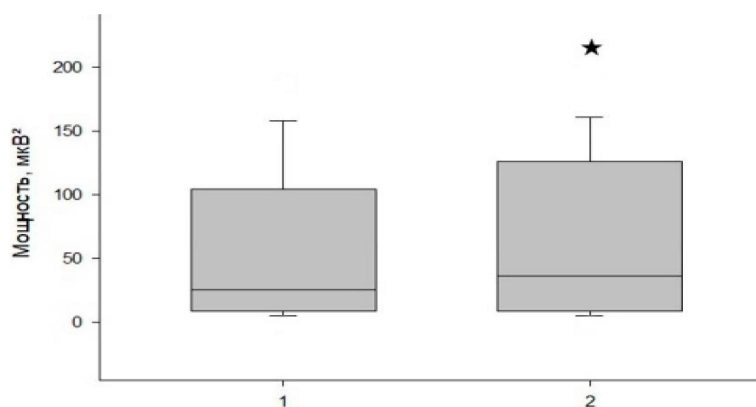


Рис. 2. Изменение спектральной мощности  $\beta$  – ритма в отведении O1 у студентов до и после использования очков виртуальной реальности:

1 – до использования VR, 2 – после использования VR,  $p \leq 0,05$

Виртуальная реальность требует интенсивной визуальной обработки, поскольку пользователи постоянно взаимодействуют с виртуальной средой, которая требует высокой степени внимания к деталям и быстрой реакции на визуальные стимулы. Повышенная активность бета-ритмов в затылочных областях указывает на то, что зрительные зоны мозга активно обрабатывают информацию, поступающую из VR-очков. Это может быть связано как с необходимостью следить за изменениями в виртуальном окружении, так и с адаптацией к новому визуальному контенту.

Повышенная активность бета-ритмов также может указывать на активное использование кратковременной памяти для удержания и обработки информации, полученной из виртуальной среды. Рабочая память, которая управляет и манипулирует этой информацией, также может быть связана с увеличением бета-активности, так как пользователи должны

быстро адаптироваться и принимать решения на основе поступающих данных.

Все испытуемые участвовали в эксперименте на основе добровольного согласия. Все этапы эксперимента были проведены в соответствии с нормами и правилами биоэтики, применяемыми в процессе исследования физиологических функций у человека.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Григорьев С.Г. Образовательные возможности технологий дополненной и виртуальной реальности / С.Г. Григорьев, М.А. Родионов, О.А. Кочеткова // Информатика и образование. 2021. № 10 (329). С. 43–56.

2. Воздействие технологии реализации реальности на психоэмоциональное состояние пациентов с афазиями / О.Э. Карпов, В.Д. Даминов, Э.В. Новак, Н.И. Слепнева // Вестник событий медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. 2021. Т. 16, № 1. С. 67–73.

3. Селиванов В.В. Влияние образовательных и тренинговых программ в виртуальной реальности на личностные характеристики испытуемых / В.В. Селиванов, П.А. Побокин, Н.С. Бабиева // Психология обучения. 2019. № 1. С. 18–28.

4. Смолин А.А. Системы виртуальной, дополненной и смешанной реальности: учеб. Пособие / А.А. Смолин, Д.Д. Жданов, И.С. Потемин, А.В. Меженин, В.А. Богатырев. Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2018. 59 с.

© Дурнев Н.А., Кузнецов В.А., Инюшкина Е.М., 2024

УДК 616.831-001.34. 616.831-009.24

## **ФУНДАМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЗАЩИТЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ ПУТЕМ ПЕРЕХОДА В ГИПОБИОТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ**

Ерениев С.И.<sup>1\*</sup>, Соколов Е.Ю.<sup>2</sup>, Степанов С.С.<sup>1</sup>, Семченко В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Омский государственный университет, г. Омск, Россия

<sup>2</sup> Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, г. Омск, Россия

\* [stepanereniev@yandex.ru](mailto:stepanereniev@yandex.ru)

На 298 беспородных белых крысах-самцах (220–250 граммов) моделировали тяжелую черепно-мозговую травму (ТСЧМТ) по способу Нобла-Коллипа под наркозом. Общая летальность 55%. В группу I (n = 64) вошли животные с «низкой судорожной активностью», в группу II (n = 68) – с «высокой». Контроль (n = 40) – крысы без травмы и судорог.

Оценивали неврологический статус. Через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после ТЧМТ головной мозг фиксировали погружением. Сенсомоторную кору (СМК) изучали с помощью световой (гематоксилин и эозин, по Нисслю) и электронной микроскопии, морфометрических, иммуногистохимических (белки p53 и bcl-2; «Дako», Дания) и статистических методов. Проверку статистических гипотез осуществляли с использованием непараметрических критериев. Через 30 суток после ТЧМТ общая численная плотность нейронов (ОЧПН) в слое III снижалась на 32,4%, а в слое V – на 20,2%. Нейроглиальный индекс в СМК (3, 7, 14 сут) увеличивался до 2,8 (2,5–3,1), контроль – 1,5 (1,2–1,9). На фоне уменьшения общей численной плотности синапсов (7, 14 и 30 суток) увеличивалась доля крупных, положительно искривленных и перфорированных контактов, которых в группе II было статистически больше, чем в группе I. Это может свидетельствовать об усилении передачи информации и быть причиной гиперактивности сохранившихся нейронов – эпилептизации с увеличением вероятности их гибели по механизмам эксайтотоксичности. Логично предположить, что снижение энергетических затрат при гипобиозе способствует выходу нейронов из патологического состояния. Именно это свойственно животным с низкой судорожной активностью.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, судорожный синдром, нейроны, глия, синапсы, гипобиоз

## **FUNDAMENTAL JUSTIFICATION OF PROTECTING THE BRAIN AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY BY INDUCING A HYPOBIOTIC STATE**

Ereniev S.I.<sup>1\*</sup>, Sokolov E.Yu.<sup>2</sup>, Stepanov S.S.<sup>1</sup>, Semchenko V.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Omsk State Medical University, Omsk, Russia

<sup>2</sup> Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia

\* stepanereniev@yandex.ru

Severe closed head injury (TBI) was modeled in 298 male white outbred rats (220-250 grams) under anesthesia using the Noble-Collip method. The overall lethality rate was 55%. Group I (n = 64) included animals with «low seizure activity», while Group II (n = 68) included those with «high seizure activity». Control group (n = 40) consisted of rats without injury or seizures. Neurological status was evaluated. Brain tissue was fixed by immersion at 1, 3, 7, 14, and 30 days after TBI. Sensory-motor cortex (SMC) was studied using light (hematoxylin and eosin, Nissl) and electron microscopy, morphometric and immunohistochemical (p53 and bcl-2 proteins; Dako, Denmark) methods. Statistical hypotheses were tested using non-parametric criteria. Thirty days after TBI, the overall numerical density of neurons (ONDN) in layer III decreased by 32.4%, and in layer V – by 20.2%. The neuroglial index in SMC (3, 7, 14 days) increased to 2.8 (2.5-3.1), compared to control – 1.5 (1.2-1.9). Decrease in overall synaptic density (7, 14, and 30 days) was accompanied by an increase in the proportion of large, positively curved, and perforated contacts, which were

statistically more abundant in Group II than in Group I. This could indicate an intensification of information transmission and be the cause of hyperactivity of surviving neurons – epileptization with an increased likelihood of their death through excitotoxic mechanisms. It is logical to assume that reducing energy costs during hypobiosis promotes the neurons' recovery from a pathological state. This is characteristic of animals with low seizure activity.

**Keywords:** closed head injury, seizure syndrome, neurons, glia, synapses, hypobiosis

### **Актуальность**

Гипобиоз (от гипо и греч. *bios* – жизнь), состояние пониженной жизнедеятельности организмов в норме. Это понятие применяется как обобщённый термин для обозначения различных по своей природе явлений, характеризующихся снижением уровня обмена веществ и общей активности: гипотермии, спячки, диапаузы, покоящихся стадий развития. Глубокий гипобиоз может перейти в анабиоз [1].

С другой стороны, гипобиоз головного мозга – это в определенной степени патологическое состояние, характеризующееся уменьшением кровотока и уровня кислорода в мозге, что может привести к нарушению его функций. Такая форма гипобиоза головного мозга может быть вызвана различными причинами. 1. Сосудистые заболевания, такие как атеросклероз, гипертония, тромбоз и другие состояния, которые могут привести к сужению или блокировке кровеносных сосудов (первичная ишемия) в мозге. 2. Недостаток кислорода (гипоксия), например, из-за заболеваний легких или аномалий в дыхательной системе. 3. Нарушения в кровоснабжении мозга из-за сахарного диабета, анемии, инсульта и других заболеваний (вторичная ишемия). 4. Травмы, опухоли и другие поражения головного мозга, которые могут препятствовать нормальному кровотоку и доставке кислорода. Исход этих состояний кроме вышеназванных патогенетических механизмов зависит еще и от активности нейронов [10, 4].

С позиций патофизиологии и биохимии защита головного мозга при черепно-мозговой травме (ЧМТ) путем перехода в гипобиотическое состояние имеет фундаментальное обоснование по нескольким причинам: 1) уменьшение возможных повреждений; при переходе в гипобиотическое состояние организм снижает активность клеточных процессов и метаболизм, что помогает уменьшить риск дальнейших повреждений головного мозга в посттравматическом периоде; 2) снижение воспалительного ответа; в ответ на травму головного мозга возникает выраженный воспалительный ответ, который в свою очередь способствует повреждению тканей и стрессу; гипобиотическое состояние вызывает снижение воспалительного ответа и усиление репаративных процессов; 3) сохранение энергии и ресурсов в нейронах; переход в гипобиотическое состояние позволяет организму сберечь энергию и ресурсы на восстановление поврежденных клеток головного мозга, что способствует более быстрой нейрореабилитации [5, 9, 11, 6].

В целом, защита головного мозга после ЧМТ путем перехода в гипобиотическое состояние может помочь ускорить процесс восстановления, снизить риск дальнейших повреждений и повысить возможность более полное восстановление функций мозга.

Таким образом, гипобиоз – это процесс снижения активности жизненных функций организма (потребления энергии). Однако, этот феномен может быть использован в медицине для улучшения выживаемости и реабилитации пациентов в терминальных и экстремальных состояниях. Поэтому применение фармакологического гипобиоза (например, искусственная кома, сон, блокада) является важным инструментом в медицине и может быть эффективным способом защиты и поддержки организма в различных ситуациях. [1].

Несмотря на очевидные успехи применения гипобиоза морфофункциональная основа его эффективности изучена недостаточно в силу сложности механизмов этого явления. До сих пор не существует единого мнения относительно всех аспектов структурно-функциональных изменений нервной ткани головного мозга при сдвиге баланса возбуждения (например, судорожный синдром) и торможения (разновидность гипобиоза) нейронов после черепно-мозговой травмы. Необходимы дальнейшие экспериментальные исследования в этом направлении для более глубокого понимания и обоснования при терминальных и экстремальных состояниях [7, 8].

Цель работы: Сопоставить структурно-функциональные и нейрофизиологические изменения головного мозга у белых крыс с высокой и низкой судорожной активностью при тяжелой сочетанной черепно-мозговой травме (ТСЧМТ) для обоснования защиты его нейронов при гипобиотических состояниях.

### **Материалы и методы**

Исследования выполнены в гистологической лаборатории ИВМиБ Омского ГАУ Минсельхоза России и в ЦНИЛ ФГБОУ ОмГМА Минздрава России в соответствии с требованиями по защите экспериментальных животных при согласовании с этическим комитетом. На 298 беспородных белых крысах-самцах массой 220–250 граммов моделировали ТСЧМТ по способу Нобла-Коллипа во вращающемся барабане путем многократного падения крысы с высоты 0,5 м под наркозом (тиопентал натрия, ОАО «Синтез», Россия, внутривенно, 30 мг/кг массы тела). Общая летальность составила 55%.

В ходе нейрофизиологического исследования оценивали спонтанные и аудиогенные судороги (86дБ, 1 мин) по 4-балльной шкале Крушинского [2]. Формировали две группы: в группу I (n = 64) вошли животные с «низкой судорожной активностью» (0–1 балл), в группу II (n = 68) – с «высокой судорожной активностью» (3–4 балла). Контрольную группу составили крысы (n = 40) без травм и судорог, наркотизированные



тиопенталом натрия. То есть, порог активации нейронов у животных этих группах был разным.

Для морфологического исследования через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после травмы осуществляли эвтаназию под ингаляционным масочным наркозом парами диэтилового эфира (ОАО «Медхимпром», Россия) путем обескровливания (рассечение сердца). Головной мозг фиксировали погружным способом в смеси 4% раствора параформальдегида, 1% раствора глутарового альдегида, 5% раствора сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4). Фронтальные срезы (4–10 мкм) сенсомоторной коры (СМК) головного мозга изучали с помощью световой микроскопии (гемотоксилин и эозин, по Нисслю), морфометрических и иммуногистохимических (белки p53 и bcl-2; «Dako», Дания) методов, а также электронной микроскопии. Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе Axioscop («Carl Zeiss», Германия) с цифровой фотокамерой «Olympus» (Япония). На цифровых изображениях определяли общую численную плотность нейронов (на 1 мм<sup>2</sup> среза), содержание нормохромных и реактивно измененных нейронов (гиперхромные несморщенные – темные клетки, гиперхромные сморщенные – пикноморфные, гипохромные и клетки-тени), рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение, нейроглиальный индекс. Морфометрическое исследование проводили с помощью программы ImageJ 1.46.

Электронномикроскопические препараты готовили в тангенциальной плоскости из блоков пирамидной формы, которые контрастировали в 1% растворе четырехоксида осмия и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие (70–100 нм) срезы (ультрамикротом «Ultracut-E», Reichert-Jung), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Съемку материала осуществляли на электронном микроскопе Hitachi-600Н. Определяли численную плотность контактов, содержание простых и перфорированных, крупных, средних и мелких контактов, а также сложных синаптических устройств [3].

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью «Statistica 8,0 for Windows». Проводили оценку характера распределения (критерий Колмогорова-Смирнова) значений переменных. Проверку статистических гипотез осуществляли с использованием непараметрических методов (ANOVA Краскела-Уоллиса, критерии Манна-Уитни, Спирмена,  $\chi^2$ ). Результаты представлены как медиана (Me). Критический уровень значимости  $p$  принимался равным 0,05.

### **Результаты и обсуждение**

В сравнении с контролем после ТЧМТ в группе I и II статистически значимо изменялись показатели всех переменных, использованных для характеристики цито- и синаптоархитектоники. Сравнение результатов морфометрического анализа нейронов, астроцитов и межнейронных синапсов показало также наличие межгрупповых различий, но не по всем срокам (табл. 1). Следовательно, можно предположить, что животные с низким и высоким порогом судорожной активности имели

морфологические особенности реакции сенсомоторной коры (СМК) на травму. В свою очередь, это в какой-то степени определяло исход патологических изменений нейронов (дистрофия – некроз, апоптоз).

Ранними (1, 3, 7 суток) морфологическими изменениями в СМК являлись гидропическая дистрофия, очаговый гиперхроматоз нейронов, пролиферация и гипертрофия астроцитов. Отмечались выраженные проявления отека-набухания нервной ткани приводило к набуханию отростков астроцитов и светлому (отечному) типу деструкции синаптических терминалей. Высокая судорожная активность в группе II, вероятно, препятствовала восстановлению нейронов. В результате через 30 суток после ТСЧМТ в слое III СМК элиминации подвергалось 45,5 (35,5–55,8) % гиперхромных нейронов, на 10% больше чем в группе I. При этом ОЧПН нейронов в слое III СМК снижалась на 32,4%, а в слое V – на 20,2% ( $p < 0,01$ , критерий Манна-Уитни).

Нейроглиальный индекс (НГИ) в СМК через 3 суток увеличивался (Манн-Уитни,  $p < 0,01$ ) до 2,8 (2,5–3,1) (в контроле 1,5; 1,2–1,9). Уменьшение ОЧПН сопровождалось сначала увеличением НГИ (через 3, 7, 14 суток), а затем – снижением этого показателя через 21, 30 суток, но контрольного уровня НГИ не достигал (1,6 против 2,2 в контроле).

У крыс с низкой судорожной активностью экспрессия апоптоз-регулирующих белков в СМК снижалась до нормы через 3 суток после ТЧМТ. При высокой судорожной активности апоптоз нервных клеток продолжал выявляться через 7 суток. Длительная активация процессов апоптоза у крыс с высокой судорожной активностью коррелирует ( $R = 0,72$ ;  $p < 0,01$ ) с выраженностью когнитивного дефицита в позднем посттравматическом периоде.

Таблица 1.

Наличие признаков изменения, различий показателей цито- и синаптоархитектоники в сенсомоторной коре головного мозга у крыс с низкой и высокой судорожной активностью при ТСЧМТ

Показатель	Проверка альтернативной статистической гипотезы (при $p < 0,05$ )		
	по срокам внутри групп (ANOVA Фридмана)		между группами (критерий Манна-Уитни), сутки
	группа I	группа II	
Общая численная плотность нейронов	Да	Да	7, 14, 30
Нормохромные нейроны	Да	Да	1, 3, 7, 14, 30
Реактивно измененные нейроны	Да	Да	1, 3, 7, 14, 30
Глиальные клетки (астроциты)	Да	Да	7, 14
Нейроглиальное отношение	Да	Да	7, 14
Ядерно-цитоплазматическое отношение в нормохромных нейронах	Да	Да	3, 7, 14

Общая численная плотность синаптических контактов	Да	Да	3, 7, 14, 30
Содержание простых и перфорированных контактов	Да	Да	3, 7, 14, 30
Соотношение крупных, средних и мелких контактов	Да	Да	3, 7, 14, 30
Соотношение изменения общей численной плотности синапсов и нейронов	Да	Да	1, 3, 7, 14, 30

Через 1 и 3 суток после травмы общая численная плотности синапсов (ОЧПС) в обеих группах уменьшалась на 32–54%. Через 7 суток в группе I (с низкой судорожной активностью) восстанавливалось 10,2%, а в группе II (с высокой судорожной активностью) – 4,5% межнейронных контактов. До контроля этот показатель в группе I восстанавливался через 14 суток, а в группе II – 30 суток. На фоне уменьшения ОЧПС через 7, 14 и 30 суток увеличивалась доля крупных, положительно искривленных и перфорированных контактов, которых в группе II было статистически больше, чем в группе I (рис. 1). Это свидетельствует об усилении передачи информации и, что может быть причиной гиперактивности сохранившихся нейронов – эпилептизации с увеличением вероятности их гибели по механизмам эксайтотоксичности.

Таким образом, нами показано, что после ТЧМТ происходит деструкция значительной части нейронов и синапсов. Гиперактивное состояние животных (группа II) усиливает процессы деструкции нейронов СМК и приводит к более выраженной перестройке межнейронных связей.

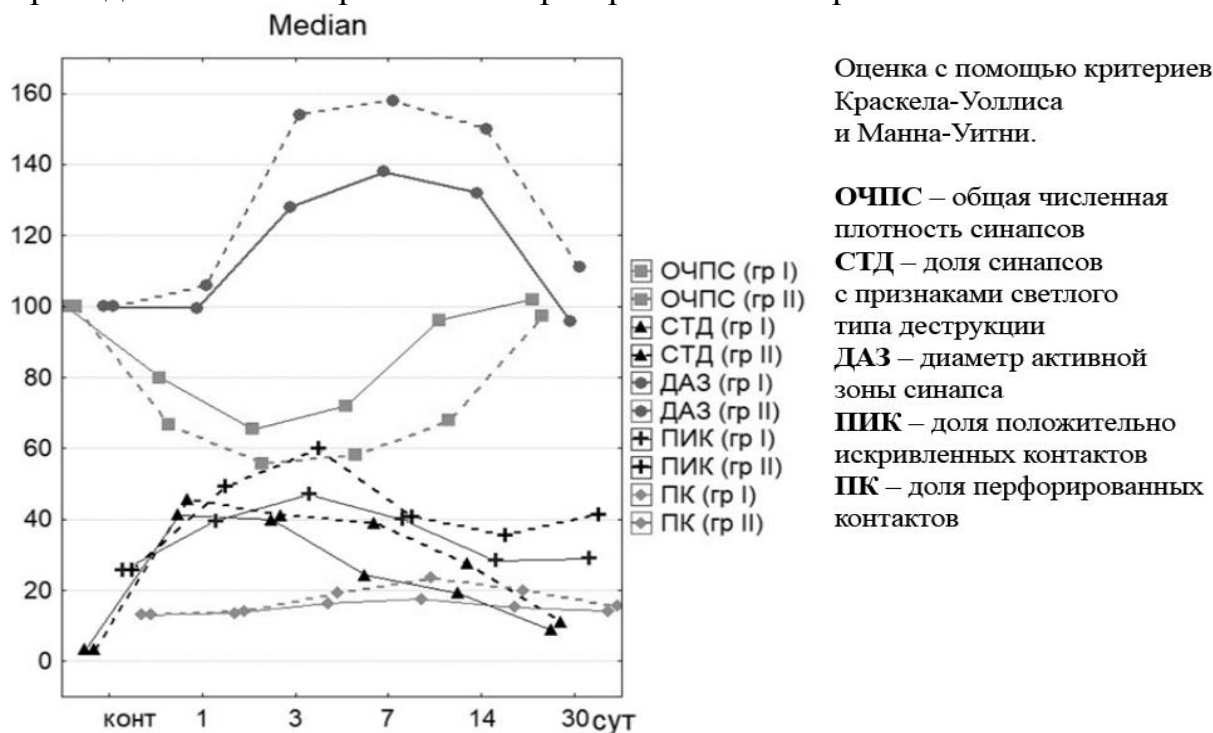


Рис. 1. Изменения относительных (%) переменных, характеризующих синаптоархитектонику сенсомоторной коры головного мозга животных группы I и II в посттравматическом периоде (1–30 сут)

Следовательно, можно полагать, что состояние относительного гипобиоза (группа I), сопровождающегося снижением активности нейронов, закономерно приводит к сохранению нейронов и меньшей патологической реорганизации их взаимоотношений в посттравматическом периоде.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Макаров А.Ф. и др. Искусственный гипобиоз как способ защиты организма в условиях острой гипобарической гипоксии // Медицина труда и промышленная экология. 2023. Т. 63, № 2. С. 102–108.

2. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – М.: Высш. шк., 1991. 399 с.

3. Семченко В.В. и др. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). М.: Директ-Медиа, 2014. 499 с.

4. Keret A. et al. Posttraumatic epilepsy: long-term follow-up of children with mild traumatic brain injury // *Neurosurg. Pediatr.* 2017. Vol. 20. № 1. Pp. 64–70.

5. Loane D.J. et al. Neuroprotection for traumatic brain injury // *Handb Clin Neurol.* 2015; Vol. 127. Pp. 343–66.

6. Marmolejo-Martínez-Artesero S. et al. Endogenous Mechanisms of Neuroprotection: To Boost or Not to Boost // *Cells.* 2021. Vol. 10, № 2. P. 370.

7. Norrils F.H., Slone L.B. Understanding research on the epidemiology of trauma and PTSD // *PTSD Res. Quarterly.* 2013. Vol. 24, № 2–3. Pp. 1–13.

8. Potts M. B. et al. Models of traumatic cerebellar injury // *Cerebellum.* 2009. Vol. 8, № 3. Pp. 211–221.

9. Stocchetti N. et al. Neuroprotection in acute brain injury: an up-to-date review // *Critical Care.* 2015. Vol. 19. № 186. Pp. 1–11.

10. Stoica A.I. Faden B.A. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury // *Neurotherapeutics.* 2010. Vol. 7. № 1. P. 3–12.

11. Tao T. et al. Natural medicine in neuroprotection for ischemic stroke: Challenges and prospective // *Pharmacol Ther.* 2020 Dec; 216:107695.

© Ерениев С.И., Соколов Е.Ю., Степанов С.С., Семченко В.В., 2024

**ОСОБЕННОСТИ МОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ БЛОКАДЫ  
КИССПЕПТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА НОЧНОЕ ПОВЕДЕНИЕ  
КРЫС В УСТАНОВКЕ «ТЕМНО-СВЕТЛАЯ КАМЕРА»**

Журавлева М.А. \*, Инюшкин А.Н.

Самарский национальный исследовательский университет  
им. академика С.П. Королёва, г. Самара, Россия

\* tkachevara@mail.ru

Супрахиазматическое ядро (СХЯ) гипоталамуса – главный циркадианный осциллятор млекопитающих и человека. Нарушения в работе данного ядра могут выражаться в изменении поведенческих паттернов. В представленном исследовании рассматривается поведение крыс самцов Wistar, которым был введен интраназально антагонист кисспептиновых рецепторов p-234 в ночные часы. Крысам до начала эксперимента меняли условия освещения свет/темнота, а после адаптационного периода наблюдали за их перемещением в установке «Темно-светлая камера» и регистрировали основные параметры реакций у животных. В результате были выявлены особенности изменения активности у крыс.

**Ключевые слова:** супрахиазматическое ядро, антагонист кисспептиновых рецепторов, поведение

**PECULIARITIES OF THE MODULATING EFFECT OF THE  
BLOCKADE OF KISSPEPTIN RECEPTORS ON THE NOCTURNAL  
BEHAVIOR OF RATS IN THE «DARK-LIGHT CHAMBER»  
INSTALLATION**

Zhuravleva M.A. \*, Inyushkin A.N.

Samara National Research University named after Academician S.P. Korolev,  
Samara, Russia

\* tkachevara@mail.ru

The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is the main circadian oscillator of mammals and humans. Violations in the function of this nucleus can be expressed in changes in behavioral patterns. The presented study examines the behavior of male Wistar rats that were injected intranasally with a kisspeptin receptor antagonist p-234 during the night hours. Light/dark lighting conditions were changed for rats before the experiment, and after the adaptation period, their movement in the Dark-light Camera installation was observed and the main parameters of reactions in animals were recorded. As a result, the peculiarities of activity changes in rats were revealed.

**Keywords:** SCN, kisspeptin receptor-antagonist, behavior

## Актуальность

Супрахиазматическое ядро (СХЯ) генерирует циркадианные ритмы, определяющие время сна и бодрствования у млекопитающих и человека. Данное ядро адаптируется к различным условиям окружающей среды при помощи нейропептидов, таких как аргинин-вазопрессин (АВП), вазоактивный интестинальный полипептид (ВИП), гастрин-высвобождающий пептид и др. Нейропептиды являются ключевыми регуляторами в синхронизации клеточных циркадианных ритмов в ядре. Помимо нейропептидов в СХЯ имеется большое количество рецепторов к другим нейрхимическим регуляторам. Ядро также воспринимает афферентные сигналы, исходящие из множества структур головного мозга [1].

Основная афферентация, определяющая синхронизацию СХЯ с внешним суточным геофизическим ритмом, осуществляется через ретиногипоталамический тракт. Дополнительные входные пути в СХЯ следуют из межколленчатой пластины таламуса, ядер шва и др. Экспрессия ВИП в СХЯ важна для реализации эффектов внешнего освещения и синхронизации нейронов СХЯ, тогда как АВП необходим для регуляции циркадианного периода и параметров эфферентного циркадианного драйва. Эфферентные сигналы СХЯ передаются в гипоталамус (субпаравентрикулярную зону, паравентрикулярное гипоталамическое ядро, преоптическую область и медиальный гипоталамус), таламус (паравентрикулярные таламические ядра) и латеральную перегородку. СХЯ также передает информацию через несколько областей мозга в шишковидную железу. Данные эфференты участвуют в регуляции поведения млекопитающих и человека.

Таким образом, в СХЯ происходит экспрессия пептидергических регуляторов, рецепторов к различным нейропептидам, осуществляется прием и обработка афферентной информации, генерируются эфферентные сигналы. Сравнительно недавно открытым нейропептидом, который может оказывать влияние на поведение при участии СХЯ гипоталамуса, является кисспептин. Кисспептин был открыт в 1996 г. и изначально был известен как метастин из-за его роли в подавлении метастазирования при меланоме и раке молочной железы. Позже, была показана его важная роль в функционировании гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси в процессе полового созревания и гаметогенеза [2].

В настоящей работе использовали интраназальный способ введения антагониста кисспептиновых рецепторов р-234. Такой способ доставки фармакологических веществ характеризуется быстрым началом воздействия. Уже через 15 минут можно наблюдать непосредственное влияние на функции головного мозга [3, 4].

Цель работы: выявить особенности модулирующего влияния антагониста кисспептиновых рецепторов р-234 при его интраназальном

введении и определить момент времени наиболее активного влияния на поведение животных в суточном цикле.

### **Материалы и методы**

Исследование, представленное в работе, соответствовало нормам гуманного обращения с животными и одобрены комиссией по биологической этике Самарского университета. Регистрировали основные параметры поведения 12 самцов крыс *Wistar* массой 240-270 г. Животных для эксперимента адаптировали в течение 21 дня к режиму освещения 12:12 ч. (свет/темнота) при свободном доступе к пище и воде.

Моделирование ночного периода суточного цикла животных осуществляли при помощи соответствующих запаздывающих сдвигов режима освещения. Введение антагониста осуществлялось каждый раз в 16 часов местного времени. Экспериментально изучена активность животных в трех моментах суточного цикла: ZT14, ZT18, ZT22 (ZT0 соответствует моменту включения освещения).

Животных разделили на контрольную и экспериментальную группы по 6 особей в каждой. Объем вводимого интраназально раствора суммарно составлял 10 мкл, концентрация антагониста кисспептиновых рецепторов p-234 (Sigma) – 0,1 мМ. Антагонист вводили билатерально в течении трех последовательных суток в одно и то же время. Крысам-самцам контрольной группы вводили натрия хлорид 0,9% в том же объеме, что и экспериментальным животным.

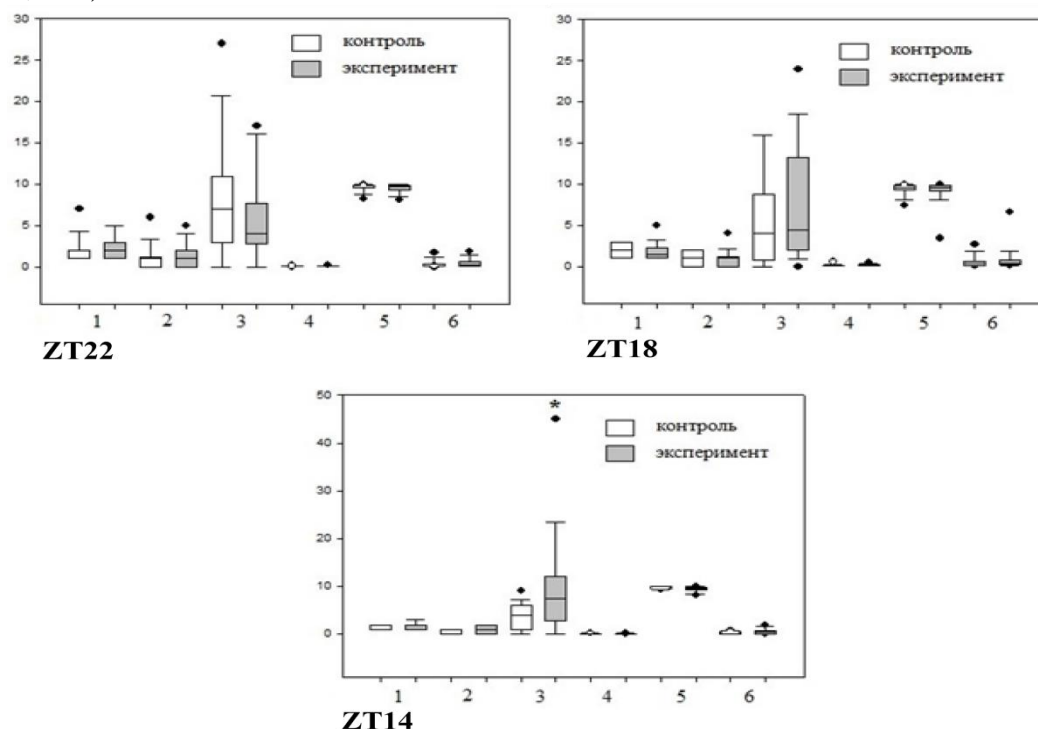
Через 15 минут после введения раствора животных помещали в установку «Темно-светлая камера» и в течении 10 минут наблюдали за активностью крыс, регистрируя поведение при помощи установленной на штатив камеры Panasonic HC-X810. Регистрацию основных поведенческих параметров производили в условиях, соответствующих дневному освещению. Активность животных оценивалась по следующим параметрам: количество заходов в темный отсек, количество выходов в светлый отсек, количество выглядываний из темного в светлый отсек, латентное время входа в темный отсек, время нахождения в темном отсеке, время нахождения в светлом отсеке.

Статистический анализ проводили при помощи t-теста или теста Манна-Уитни (когда данные выборки не соответствовали нормальному распределению или при неоднородности дисперсий). Нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро-Уилка. Однородность дисперсий определяли посредством теста Левена. Статистически значимыми считались различия с  $P < 0,05$ .

### **Результаты и обсуждение**

На рисунке представлены значения исследуемых параметров поведения крыс в моменты суточного цикла ZT22, ZT18 и ZT14 при сравнении контрольной и экспериментальной групп.

Значимые статистические различия между контрольной и экспериментальной группами были получены в моменте ZT14. В этот момент количество выглядываний из тёмного в светлый отсек, статистически значимо увеличивалось в экспериментальной группе ( $P = 0,045$ ).



*Рис. 1.* По оси абсцисс: 1 – количество заходов в темный отсек, 2 – количество выходов в светлый отсек, 3 – количество выглядываний из тёмного в светлый отсек, 4 – латентный период входа в темный отсек (с), 5 – время нахождения в темном отсеке (с), 6 – время нахождения в светлом отсеке (с). По оси ординат: значения показателей. \*  $P < 0,05$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что блокада кисспептиновых рецепторов оказывает не сильно выраженное, но статистически значимое влияние на поведение крыс, проявляющееся при введении антагониста в начале субъективного ночного периода. Выявленный эффект можно охарактеризовать как увеличение выраженности исследовательской активности, и снижение уровня тревожности. По всей видимости, обнаруженная активность антагониста объяснялась его взаимодействием со специфическими кисспептиновыми рецепторами головного мозга, при этом избирательный эффект блокады в один специфический момент суточного цикла указывает на непосредственное участие СХЯ.

Механизм анксиолитического действия антагониста кисспептиновых рецепторов может быть связан с изменением параметров калиевых токов, в частности, быстрого инактивируемого калиевого тока, тока входящего выпрямления и медленного постгиперполяризационного тока, активируемого кальцием [5]. Проведенное исследование открывает



перспективу применения антагониста в качестве анксиолитика нового поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00152).

### Список литературы

1. Ono D., Weaver D.R., Hastings M.H., Honma K.I., Honma S., Silver R. The Suprachiasmatic Nucleus at 50: Looking Back, Then Looking Forward. *J Biol Rhythms*. 2024 Apr; 39(2):135-165. doi: 10.1177/07487304231225706. Epub 2024 Feb 16. PMID: 38366616; PMCID: PMC7615910.

2. Velmurugan H., Srikanth Mannava A., Thangaraju P., Neelambaran K. Kisspeptin and its Current Clinical Status- A Systematic Review. *Curr Med Chem*. 2024 Jan 22. doi: 10.2174/0109298673251224230919093656. Epub ahead of print. PMID: 38265397.

3. Петрова А.А., Инюшкин А.Н. Влияние нейропептида Y на поведенческий ритм локомоторной активности крыс // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2018. № 68(1). С. 92–107.

4. Tsuno Y., Mieda M. Circadian rhythm mechanism in the suprachiasmatic nucleus and its relation to the olfactory system. *Front Neural Circuits*. 2024 Mar 25;18:1385908. doi: 10.3389/fncir.2024.1385908. PMID: 38590628; PMCID: PMC11000122.

5. Ткачева М.А., Инюшкин А.Н. Электрофизиологические эффекты кисспептина на уровне нейронов биологических часов супрахиазматического ядра // Врач-аспирант. 2017. Т. 80. No 1. С. 86–92.

© Журавлева М.А., Инюшкин А.Н., 2024

УДК 591.481.1:577.175.824]:577.017.645:599.323.4

## ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ОНТОГЕНЕЗ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МОЗГА

Заерко А.В.\*

УО Гродненский государственный медицинский университет,  
г. Гродно, Беларусь

\*wersall\_91@mail.ru

Изучение постнатального развития гистаминергических нейронов гипоталамуса представляет большой интерес, учитывая важность и недостаточную изученность этих клеток, что и обуславливает цель данного исследования.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на 5-, 10-, 20-, 45- и 90-суточных беспородных белых крысах (72 крысенка). Проведена электронно-микроскопическая оценка органелл гистаминергических

нейронов, гистохимическое исследование активности ключевых окислительных ферментов этих клеток и иммуногистохимическая оценка содержания в них MAO B, NeuN, АТФ-синтазы и нейроглобина.

**Результаты.** Исследование постнатального онтогенеза гистаминергических нейронов ядра E2 заднего гипоталамуса с 5-х по 90-е сутки показало, что в этот период значительно уменьшается плотность расположения тел описываемых клеток и увеличивается расстояние между ними. Наиболее активный рост перикарионов гистаминергических нейронов происходит с 5-х по 10-е сутки после рождения. Изменения на микроскопическом уровне идут параллельно с метаболической дифференцировкой этих нейронов, включающей в себя переключение с анаэробного на аэробный способ получения энергии, а также происходит синхронное нарастание содержания ряда молекулярных маркеров, отражающих процесс дифференцировки этих нейронов: MAO B, NeuN, нейроглобина и АТФ-синтазы.

**Ключевые слова:** гистаминергические нейроны, постнатальный онтогенез, гипоталамус

## **NEURONS OF THE CINGULATE CORTEX OF THE RAT BRAIN WITH CHOLESTASIS**

Zaerko A.V.\*

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

\* wersall\_91@mail.ru

**Relevance.** Studying the postnatal development of histaminergic neurons of the hypothalamus is of great interest, given the importance and lack of knowledge of these cells, which determines the purpose of this study.

**Material and methods.** The study was carried out on 5-, 10-, 20-, 45- and 90-day-old outbred white rats (72 pups). An electron microscopic assessment of the organelles of histaminergic neurons, a histochemical study of the activity of key oxidative enzymes of these cells and an immunohistochemical assessment of the content of MAO B, NeuN, ATP synthase and neuroglobin in them were carried out.

**Results.** A study of the postnatal ontogenesis of histaminergic neurons of the E2 nucleus of the posterior hypothalamus from the 5th to the 90th day showed that during this period the density of the cell bodies of the described cells decreases significantly and the distance between them increases. The most active growth of the perikarya of histaminergic neurons occurs from the 5th to the 10th day after birth. Changes at the microscopic level go in parallel with the metabolic differentiation of these neurons, including a switch from anaerobic to aerobic method of obtaining energy, and there is also a synchronous increase in the content of a number of molecular markers reflecting the process of differentiation of these neurons: MAO B, NeuN, neuroglobin and ATP synthase.

**Keywords:** histaminergic neurons, postnatal ontogenesis, hypothalamus

## **Актуальность**

Гистаминергические нейроны головного мозга регулируют многие функции и системы организма. Гистамин обладает антигипнотическим действием – сокращает парадоксальную фазу сна и облегчает пробуждение; стимулирует общую двигательную и половую активность; оказывает анальгетическое действие; усиливает жажду, но подавляет аппетит; участвует в регуляции артериального давления (повышает его), температуры тела (снижает её), энергетического метаболизма мозга (стимулирует гидролиз гликогена). Известна роль центрального гистамина при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и энцефалопатия Вернике и др. У млекопитающих перикарионы гистаминергических нейронов головного мозга локализованы только в заднем отделе гипоталамуса, в туберомамиллярных ядрах, там они формируют пять ядер (E1–E5). Гистаминергическое ядро E2 – самое крупное ядро, на него приходится более 50% гистаминергических нейронов гипоталамуса. Подробно изучены расположение, пространственная организация, морфофункциональные особенности гистаминергической нейромедиаторной системы головного мозга у млекопитающих [1]. В то же время изучение развития данных нейронов в динамике постнатального онтогенеза не проводилось.

Цель исследования: изучить особенности постнатального развития гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс.

## **Материалы и методы**

Исследование выполнено на потомстве беспородных белых крыс (всего 72 крысенка) 5, 10, 20, 45 и 90-суточного возраста. Для получения потомства самцов и самок интактных животных (с исходной массой  $180 \pm 20$  г) брали из вивария Гродненского государственного медицинского университета. Научная работа выполнена в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета №2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей, с учетом правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Декапитация крысят осуществлялась на 5-е, 10-е, 20-е, 45-е и 90-е сутки после рождения (для лучшей оценки динамики развития брали по одному крысенку из каждого помета на каждый срок, всего по 6 крысят), быстро извлекали головной мозг, вырезали гипоталамус и замораживали его в парах жидкого азота. В криостате готовили серийные фронтальные срезы заднего гипоталамуса толщиной 12 мкм, часть из которых окрашивали по методу Ниссля (0,1% водным раствором тионина) для оценки строения гистаминергических нейронов, остальные срезы обрабатывали на выявление оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), с пентозофосфатным путем – глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ф-ДГ), с транспортом электронов – НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ), внемитохондриальным окислением

и синтезом нуклеиновых кислот – дегидрогеназы восстановленного НАДФ (НАДФН-ДГ) и гликолизом – лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Для иммуногистохимического исследования образцы гипоталамуса фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4°C (на ночь) [2], затем заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Leica RM 2125 RTS (Leica Microsystems GmbH, Германия), монтировали на предметные стекла. Препараты обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии, без процедуры теплового демаскирования антигенов.

Для иммуногистохимического выявления МАО Б – ключевого фермента метаболизма гистамина в мозге и маркера гистаминергических нейронов гипоталамуса – применяли первичные поликлональные кроличьи антитела против МАО Б (cat. No. EPP15673, Elabscience, Китай) в разведении 1:100 (при +4°C во влажной камере в течение 20 ч). Связавшиеся первичные антитела выявляли с помощью набора детекции (cat. No. E-IR-R213, Elabscience, Китай).

С целью определения зрелости нейронов в развивающемся гипоталамусе определяли нейрональный ядерный белок (NeuN, маркер зрелых нейронов). Применяли первичные поликлональные кроличьи антитела против NeuN (cat. No. ab.128886, Abcam, Великобритания) в разведении 1:400 (при +4°C во влажной камере в течение 20 ч). Для определения иммунореактивности АТФ-синтазы – молекулярного маркера митохондрий, расположенного на кристах внутренней мембраны митохондрий, использовали первичные моноклональные мышинные антитела Anti-ATP5A antibody (cat. No. ab. 14748, Abcam, Великобритания) в разведении 1:2400 (при +4°C, во влажной камере, экспозиция – 20 ч). Для иммуногистохимического выявления нейроглобина (Ngb) – белка, вовлеченного в поддержание газового гомеостаза клетки, – применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Ngb antibody (cat. No. ab. 37258, Abcam, Великобритания) в разведении 1:600 (при +4°C, во влажной камере, экспозиция – 20 ч). Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit (cat. No. ab. 80436, Abcam, Великобритания).

Для электронно-микроскопического исследования образцы гипоталамуса 5-ти, 20-ти и 45-суточных животных помещали в 1% осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (pH = 7,4) на 2 часа при температуре +4° С. Далее их промывали в смеси буфера Миллонига и сахарозы, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне и заключали в заливочную смесь смол. Ультратонкие срезы контрастировали ацетатом урана и цитратом свинца и изучали под электронным микроскопом JEM-1011 (JEOL, Япония), фотографировали цифровой камерой Olympus Mega View III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Ультраструктурную морфометрию проводили с помощью программы для обработки изображения iTEM (версия 5.0) (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия).

Количественную оценку размеров и формы нейронов проводили на окрашенных по методу Ниссля препаратах, измеряя минимальный и максимальный диаметры, периметр, площадь, объем нейронов, форм-фактор и фактор элонгации. Для оценки активности ферментов и иммунореактивности маркеров определяли оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакции. Полученные данные обрабатывали методами непараметрической статистики.

### **Результаты и обсуждение**

В постнатальном онтогенезе крысы происходят значительные микроскопические изменения гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса. Так, с пятых по 90-е сутки после рождения крыс наблюдается увеличение площади сечения их перикарионов (в 3,5 раза) и расстояния между ними (в 5,7 раза). Наиболее интенсивно данные изменения происходят в ранний постнатальный период (с пятых по 20-е сутки). При этом число гиперхромных нейронов снижается в 5 раз, особенно в пубертатный период (с 20 по 45-е сутки), что сопровождается возрастанием количества нормохромных гистаминергических нейронов (в 1,3 раза).

На 5-45-е сутки после рождения в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крысы увеличивается площадь сечения ядер (в 1,6 раза) и уменьшается ядерно-цитоплазматическое отношение (в 1,9 раза), снижается число (с 1,63 до 1,46 штук/ядро) и увеличиваются размеры (в 2,5 раза) ядрышек. При этом происходит смещение их от кариолеммы к центру ядра, изменение их структурной организации (переход от компактных ядрышек к ядрышкам ретикулярного типа), уменьшение ассоциированного с ядрышком гетерохроматина и «облака» мигрирующих субъединиц рибосом между ядрышком и кариолеммой, которая становится менее складчатой, с повышением числа ядерных пор (в 1,4 раза). В ядре встречаются тельца Кахаля, преимущественно контактирующие с ядрышками и формирующие на 20-е сутки после рождения перинуклеолярные кольцевые скопления в форме розеток.

В постнатальном онтогенезе в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы формируются функциональные аппараты клетки: энергетический, синтетический, переваривания и защиты. Увеличивается число митохондрий (в 1,7 раза) и занимаемая ими относительная площадь в цитоплазме (в 1,7 раза); митохондрии вытягиваются, в них увеличивается длина крист (в 1,5 раза). На цистернах ГрЭС возрастает количество связанных рибосом (в 2,1 раза), при этом число свободных рибосом не меняется. Формируется комплекс Гольджи: от группы пузырьков и вакуолей на пятые сутки до характерного для взрослых животных изогнутого скопления плоских цистерн на 45-е сутки. При этом увеличивается количество лизосом (в 2,5 раза) и, соответственно, плотность их расположения в клетках (в 2,3 раза). В ранний постнатальный период (пятые и 20-е сутки после рождения) в цитоплазме гистаминергических

нейронов выявляются крупные ядрышкоподобные тельца, к 45-м суткам они уменьшаются.

С пятых по 90-е сутки постнатального онтогенеза крыс в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса прогрессивно нарастает активность фермента окислительного дезаминирования гистамина моноаминоксидазы типа Б (МАО Б, в 5,9 раза) и фермента глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (в 3,5 раза). Активность дегидрогеназ сукцината, лактата, восстановленных НАД и НАДФ меняется разнонаправленно, что отражает становление медиаторного и энергетического метаболизма гистаминергических нейронов. В постнатальный период в цитоплазме этих нейронов постепенно снижается содержание рибонуклеопротеинов (в 1,8 раза).

В постнатальном онтогенезе крысы в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса происходит синхронное нарастание содержания ряда молекулярных маркеров, отражающих процесс дифференцировки этих нейронов: МАО Б (в 3,7 раза), NeuN (в 1,4 раза), нейроглобина (в 1,6 раза) и АТФ-синтазы (в 1,5 раза).

### **Список литературы**

1. Зиматкин, С.М. Гистаминергические нейроны мозга: монография / С.М. Зиматкин. Минск: Новое знание, 2015. 319 с.
2. Коржевский, Д.Э. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях / Д.Э. Коржевский, И.П. Григорьев, В.А. Отеллин // Морфология. 2006. Т. 129, № 1. С. 85–86.

Заерко А.В., 2024

УДК 611.81.018.82:616-008.9-092.18

## **ИММУНОГИСТОХИМИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ НЕЙРОНОВ МОЗГА**

Зиматкин С.М.\*

УО Гродненский государственный медицинский университет,  
г. Гродно, Беларусь

\* smzimatkin@mail.ru

Целью работы явилось обобщение собственного опыта иммуногистохимических исследований нейронов мозга. Проведено на крысах разного возраста в норме и при экспериментальной патологии. Образцы мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде и заключали в парафин, серийные срезы окрашивали иммуногистохимически. Оценивали нейромедиаторную природу нейронов, выявляя в них ферменты синтеза или деградации нейромедиаторов. Используя маркер Ki-67,

избирательно визуализировали делящиеся предшественники нейронов, маркер даблкортин – мигрирующие предшественники нейронов, маркер NeuN – зрелые нейроны. Для оценки энергетического потенциала нейронов выявляли АТФ-синтазу, депо кислорода – нейроглобин, аутофагии – AMBRA1, депонирования кальция – кальбиндин, белка гена быстрого реагирования c-Fos, синаптического аппарата – синаптофизин. Иммуногистохимические исследования молекулярных маркёров являются эффективным инструментом для оценки состояния нейронов мозга в норме и при различной патологии.

**Ключевые слова:** молекулярные маркеры, иммуногистохимия, нейроны, мозг

## **IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN NEURON STUDIES BRAIN**

Zimatkin S.M.\*

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

\*smzimatkin@mail.ru

The purpose of the work was to summarize our own experience of immunohistochemical studies of brain neurons. Conducted on rats of different ages under normal conditions and with experimental pathology. Brain samples were fixed in zinc-ethanol-formaldehyde and embedded in paraffin, and serial sections were immunohistochemically stained. The neurotransmitter nature of neurons was assessed by identifying enzymes in them for the synthesis or degradation of neurotransmitters. Using the Ki-67 marker, dividing neuronal precursors were selectively visualized, the doublecortin marker – migrating neuronal precursors, and the NeuN marker - mature neurons. To assess the energy potential of neurons, ATP synthase, oxygen storage – neuroglobin, autophagy – AMBRA1, calcium storage – calbindin, rapid response gene protein c-Fos, synaptic apparatus – synaptophysin were identified. Immunohistochemical studies of molecular markers are an effective tool for assessing the state of brain neurons under normal conditions and in various pathologies.

**Keywords:** molecular markers, immunohistochemistry, neurons, brain

### **Актуальность**

В последние десятилетия в нейроморфологии и нейрохимии все шире используется иммуногистохимические методы для микроскопического исследования молекулярных маркёров нейронов в нормальном взрослом и развивающемся мозге или при различной нейропатологии [1]. Эти методы оказываются более точными и эффективными, по сравнению с традиционными, классическими нейрогистологическими и гистохимическими методами, которые оценивают строение нейронов и содержание в них различных веществ или активность ферментов. Иммуногистохимическими методами в нейронах можно выявить любые белки, пептиды и другие вещества к которым удаётся получить антитела,

которые будут специфически связываться с ними и в дальнейшем выявляться меченными вторичными антителами.

Цель работы: обобщение собственного опыта иммуногистохимических исследований нейронов мозга.

### **Материалы и методы**

Исследование проведено на крысах различного возраста в норме и при различной экспериментальной патологии (холестаз, потомство крыс с холестазом, или потреблявших алкоголь во время беременности, церебральная ишемия, вызванная перевязкой сонных артерий, и др.). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Животных забивали быстрой декапитацией. Образцы соответствующих отделов мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4°C в течение 20 часов, для хорошего сохранения антигенных свойств изучаемых молекулярных маркеров [1], обезжировали в спиртах, просветляли в ксилолах и заключали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Leica 2125 RTS (Германия) и монтировали на предметные стекла. Один срез из каждой серии окрашивали по методу Ниссля для идентификации структур мозга по атласу [2]. Другие срезы серии окрашивали иммуногистохимически для выявления необходимых молекулярных маркеров. Среди сотен имеющихся на рынке маркёров были выбраны те, которые наиболее эффективно оценивают состояние нейронов, а также применимы для парафиновых срезов мозга крысы.

Изучение иммуногистохимических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Полученные первичные цифровые данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows.

### **Результаты и обсуждение**

Все описанные ниже молекулярные маркеры показали себя весьма эффективными и специфическими для характеристики нейронов мозга. Определение нейромедиаторной природы нейронов. В своих исследованиях мы в качестве маркера ГАМК-ергических нейронов мозжечка использовали фермент синтеза ГАМК, глутаматдекарбоксилазу, а в качестве маркера гистаминергических нейронов гипоталамуса фермент деградации гистамина – моноаминоксидазу Б. Экспрессия этих ферментов избирательно возрастала при постнатальном развитии, дифференцировке именно соответствующих типов нейронов [3–4].

Выявление делящихся предшественников нейронов. Маркёр делящихся нейронов пептид *Ki-67*, иммуногистохимически выявляется в ядрах делящихся предшественников нейронов во временном, наружном



зернистом слое коры развивающегося мозжечка (7–15 день после рождения крысы).

Мигрирующие предшественники нейронов можно выявить по белку, стабилизирующему микротрубочки, необходимые для миграции этих клеток, *даблкортину*. Мы успешно использовали этот маркер для выявления предшественников зернистых нейронов, мигрирующих из наружного во внутренний зернистый слой развивающегося мозжечка [5].

Оценка зрелости нейронов мозга. После завершения миграции предшественников нейронов, по мере их созревания, дифференцировки, в них образуются и накапливаются специфические белки и пептиды, например, участвующий в сплайсинге, *NeuN*. Этот маркер зрелых нейронов мы использовали для оценки созревания зернистых нейронов коры и нейронов ядер мозжечка, а также гистаминергических нейронов гипоталамуса в постнатальный период развития мозга крысы [5].

Энергетический аппарат нейронов представлен митохондриями. Именно в них образуется большая часть АТФ клетки, необходимая для её функционирования. Важнейшим ферментом, образующим АТФ, является АТФ-аза. Этот мультисубъединичный белковый комплекс участвует и в образовании крист внутренней мембраны митохондрий [6]. Поэтому его содержание в нейронах отражает их энергетическое обеспечение. Этот молекулярный маркер оказался удобным для сравнительной оценки энергетического потенциала нейронов разных отделов мозга, для характеристики его становления в развивающихся нейронах мозга и для оценки его нарушений при церебральной ишемии и при холестазах [7–10].

Депозит кислорода в нейронах. Белок *нейроглобин* способен связывать и депонировать кислород в нейронах, а также передавать его митохондриям, участвуя в энергообеспечении этих нервных клеток [11]. Он расположен в цитоплазме нейронов вблизи митохондрий. Мы изучили региональное и клеточное распределение этого молекулярного маркера в мозге крысы, накопление его в развивающихся нейронах мозга и изменения в нейронах разных отделов мозга крысы при церебральной ишемии и холестазах [12–14].

Аутофагия – процесс элиминации в клетках ненужных и повреждённых мембран и органелл, который обеспечивается главным образом лизосомами. Аутофагия естественно усиливается при напряжённой работе нейронов, при неблагоприятных воздействиях и патологических состояниях. Для изучения регуляции этого процесса в нейронах оценивают в них активатор аутофагии *AMBRA1*. Мы показали возрастание его содержания в нейронах мозга при холестазах [15].

Депозит кальция в нейронах. Ионы кальция необходимы для возбуждения нейронов и передачи нервных импульсов между нейронами. Избыточное накопление свободного кальция в нейронах приводит к их перевозбуждению, эксайтотоксичности, ведущей к их повреждению и гибели. Из белков, депонирующих кальций и предупреждающих накопление его свободных ионов в клетке, мы изучали *кальбиндин* в развивающихся нейронах мозга и при холестазах [16, 17].

Выявление белка гена быстрого реагирования. Ген *c-Fos* активируется в условиях требующих быстрой мобилизации нейронов мозга в экстремальных условиях. При этом в нейронах экспрессируется и накапливается белок *c-Fos*. Мы наблюдали появление и накопление этого белка в нейронах в ранние сроки холестаза, отражающих процессы их адаптации, способствующие выживанию нейронов в неблагоприятных условиях, например, при накоплении в организме билирубина и токсических желчных кислот при моделировании холестаза у крыс [18].

Оценка синаптического аппарата. Синапсы являются основными коммуникационными соединениями между нейронами, определяющими работу мозга. Их хорошим маркером является белок синаптических пузырьков, *синаптофизин*. Мы наблюдали его накопление на поверхности тел нейронов (визуализирует аксосоматические синапсы) и в нейропиле (аксодендритические синапсы) в развивающемся мозге в период синаптогенеза и нарушение этого процесса у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности [19, 20]. Подробнее вышеизложенные данные представлены в монографии [21].

### **Заключение**

Иммуногистохимические исследования специфических молекулярных маркеров являются надёжным и эффективным инструментом для оценки состояния нейронов мозга в норме и при различной патологии.

### **Список литературы**

1. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Гилерович Е.Г. Иммуногистохимическое исследование головного мозга. СПб.: СпецЛит, 2017. 143 с.
2. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition. London: Academic Press, 2007. 456 p.
3. Зиматкин С.М., Карнюшко О.А. Постнатальное развитие ГАМК-ергических нейронов мозжечка крысы // Морфология. 2020. № 1. С. 13–17.
4. Зиматкин С.М., Заерко А.В. Моноаминоксидаза в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы // Морфология. 2021. Т. 159 (1). С. 13–19.
5. Зиматкин С.М., Карнюшко О.А. Экспрессия даблкортина и NeuN в развивающихся нейронах мозжечка крысы / С.М. Зиматкин, // Морфология. 2016. № 1. С. 38–42.
6. Узлова, Е.В., Зиматкин С.М. АТФ-синтаза клеток // Успехи современной биологии. 2020. Т. 140, № 5. С. 1–10.
7. Емельянчик С.В., Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Изменения иммунореактивности АТФ-синтазы в нейронах коры мозга и мозжечка крыс при холестаза // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2018. № 2. С. 55–60.
8. Карнюшко, О.А., Кот В.Р., Зиматкин С.М. Развитие энергетического аппарата клеток Пуркинье мозжечка крысы в

постнатальном онтогенезе // Оренбургский медицинский вестник. 2020. № 1(29). С. 53–59.

9. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. АТФ-синтаза в нейронах мозга крысы // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021. № 3. С. 17–27.

10. Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. Изменения иммунореактивности АТФ-синтазы и хроматофилии цитоплазмы нейронов теменной коры мозга крыс в условиях ступенчатой церебральной ишемии // Оренбургский медицинский вестник. 2020. №4 (32). С. 26–31.

11. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. Нейроглобин: строение, функции, локализация в мозге в норме и при патологии // Новости медико-биологических наук. 2019. Т. 19, № 1. С. 91–96.

12. Емельянчик С.В., Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Нейроглобин в грушевидных нейронах мозжечка крыс при холестазе // Морфология. 2019. Т. 155(1). С. 7–11.

13. Емельянчик С.В., Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Нейроглобулин в нейронах лобной и теменной коры головного мозга белых крыс при холестазе / С.В. Емельянчик // Журнал анатомии и гистопатологии. 2020. Т. 9 (1). С. 24–29.

14. Узлова Е.В., Зиматкин С.М. Нейроглобин в нейронах мозга крысы // Сибирский научный медицинский журнал. 2021. Т. 41 (4). С. 30–39.

15. Емельянчик С.В. Аутофагия в нейронах фронтальной коры мозга крысы при холестазе / С.В. Емельянчик // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 5, Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. 2019. Т. 9. № 2. С. 134–141.

16. Емельянчик С.В., Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Иммуногистохимия кальбиндина в нейронах коры головного мозга и мозжечка при холестазе у крыс // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2019. Т. 18(1). С.21–29.

17. Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Иммуногистохимическое исследование кальбиндина в развивающемся мозжечке крысы // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020. Т. 18 (6). С. 692–697.

18. Емельянчик С.В., Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Экспрессия белка c-FOS в нейронах новой коры мозга крыс при холестазе // Новости медико-биологических наук. 2018. Т. 18, № 1. С. 158–160.

19. Зиматкин С.М., Карнюшко О.А. Синаптогенез в развивающемся мозжечке крысы // Морфология. 2016. № 4. С. 34–39.

20. Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Нарушение синаптогенеза в коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2017. № 5. С. 538-543.

21. Зиматкин С.М. Иммуногистохимич в оценке нейронов мозга: монография. Гродно: ГрГМУ, 2023. 132 с.

© Зиматкин С.М., 2024

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *CIRSIIUM ARVENSE* НА УРОВЕНЬ  
ДЕПРЕССИВНОСТИ КРЫС ЛИНИИ WAG/RIJ В ТЕСТЕ  
«ВЫНУЖДЕННОЕ ПЛАВАНИЕ»**

Киреева И.И.\* , Садртдинова И.И., Фархутдинов Р.Г.

Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, Россия

\* irnka.13062002.super@mil.ru

В связи с увеличением числа болезней связанных с депрессией, актуально изучение влияния малоизученных видов растений на течение эпилепсии, так как природные компоненты легко усваиваются и малоокисны. Цель работы заключалась в оценке депрессивности крыс линии WAG/Rij до и после введения экстракта *Cirsium arvense*. Анализировали изменение поведенческих параметров в течение 21-го дня. Было показано, что с увеличением продолжительности введения экстракта уменьшалось время иммобилизации, что отражает снижение депрессивности у самцов и самок.

**Ключевые слова:** вынужденное плавание, крысы линии WAG/Rij, *Cirsium arvense*, уровень депрессивности

**THE EFFECT OF CIRSIIUM ARVENSE DECOCTION  
ON THE LEVEL OF DEPRESSION IN WAG/RIJ RATS  
IN THE «FORCED SWIMMING» TEST**

Kireeva I.I.\* , Sadrtdinova I.I., Farkhutdinov R.G.

Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

\* irnka.13062002.super@mil.ru

Due to the increase in the number of depression-related diseases, it is important to study the effect of poorly studied plant forms on the course of epilepsy. The aim of the work was to analyze the behavioral parameters of WAG/Rij rats before and after administration of *Cirsium arvense* decoction. The change in behavioral parameters was assessed during the 21st day. It was shown that with an increase in the duration of administration of the decoction, the immobilization time decreased, which reflects a decrease in depression in males and females.

**Keywords:** forced swimming, rats of the WAG/Rij line, *Cirsium arvense*, level of depression

**Актуальность**

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2022 года одним из многочисленных последствий пандемии COVID-19 стало развитие глобальной кризисной ситуации в области психического здоровья. Согласно оценкам ВОЗ, число случаев как тревожных, так и депрессивных расстройств выросло более чем на 25% в течение первого года пандемии [9].

Поэтому повышен спрос в данное время на успокаивающие средства, которые также могут благотворно влиять на течение эпилепсии. К таким препаратам можно отнести те, которые обладают седативным и анксиолитическим свойством [6].

Многие органические структуры имеют сложное строение и их нелегко получать из-за многоступенчатости процесса органического синтеза, поэтому рациональнее использовать выделяемые природные вещества [8]. Растительные средства имеют преимущество благодаря натуральным компонентам по сравнению с синтетическими, ведь они легче усваиваются и менее аллергенны [5]. Так, *Cirsium arvense* L. (бодяк полевой) является малоизученным, но преимущественно потенциальным, так как обладает низкой токсичностью, широким спектром биологически активных веществ, легко культивируем [7]. Бодяк полевой используют как средство для лечения различных нервных расстройств и эпилепсии [7]. Исследование поведенческих параметров крыс линии WAG/Rij до и после введения экстракта бодяка полевого может быть направлено на оценку влияния биологически активных веществ растения на течение эпилепсии и депрессии [1].

Цель работы: исследование уровня депрессивности крыс линии WAG/Rij под влиянием экстракта *Cirsium arvense*.

#### **Материалы и методы**

Исследование выполнено на половозрелых самцах (n=10) крыс линии WAG/Rij которые являются признанной моделью абсансной эпилепсии человека, массой тела 220-240 г. (в возрасте шести месяцев). Крысы содержались в условиях вивария Института природы и человека УУНиТ. При работе с крысами полностью соблюдались международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (2000 г.).

Для приготовления 200 мл экстракта использовали 5 грамм бодяка полевого и 210 мл дистиллированной воды. Готовили на водяной бане 30 минут [3]. Для оценки уровня депрессивности мы проводили тест «вынужденное плавание» по Порсолту (Porsolt R.D. et al., 1977) с 13:00 до 17:00. Поведение регистрировали в течение 5 минут. При проведении теста учитывались такие поведенческие параметры как: время иммобилизации (сек), активное и пассивное плавание (сек), количество ныряний, отряхиваний, касаний стенок и количество фекальных болюсов. Время, проведенное в каждом из этих состояний, анализируется для оценки уровня депрессии у крыс. Кроме того, вычисляли индекс депрессивности (ИД), определяемый отношением числа самых коротких периодов иммобилизации длительностью до 6 сек к общему числу периодов активного плавания [2]. Статистическую обработку данных проводили в программе «Statistica v. 10.0» с помощью Т-критерия Вилкоксона.

#### **Результаты и их обсуждение**

Результаты исследования показали статистически достоверное увеличение общего времени активного плавания к 21-му дню перорального

введения экстракта *Cirsium arvense* по сравнению с контрольной группой (табл.1).

Таблица 1.

Сравнительный анализ поведенческих параметров у самцов крыс линии WAG/Rij в тесте «Вынужденное плавание» до и после введения экстракта *Cirsium arvense*

Поведенческие параметры теста	I	II	III	IV
Число ныряний, n	2,14±0,80	0,29±0,29	0,43±0,43	0,00±0,00
Количество болюсов, n	2,43±0,30	2,00±0,49	1,29±0,36	1,29±0,71
Количество касаний стенок, n	81,43±8,57	91,86±6,58	64,29±5,35	60,14±5,25*^
Количество отряхиваний, n	42,14±4,69	48,14±4,17	54,71±4,34	62,71±2,90*^
Груминг, n	0,86±0,46	0,86±0,70	1,14±0,55	0,57±0,43
Общее время пассивного плавания, с	218,71±9,73	202,29±8,29	192,57±9,59	174,86±7,71*
Суммарная продолжительность активного плавания, с	62,14±10,55	87,57±8,44	99,57±10,52	119,14±8,68*
Суммарное время иммобилизации, с	19,14±4,79	10,14±1,22*	7,86±1,18*	6,00±1,51*

Обозначения: I – контрольная группа; II – 7-ой день введения экстракта; III – 14-ый день введения экстракта; IV – 21-ый день введения экстракта.

Примечание: \* - статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) при сравнении с контрольной группой; ^ - статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) при сравнении 7-ого дня введения экстракта со значениями 21-ого дня.

Продолжительность пассивного плавания снизилась с 218,71±9,73 сек. до 174,86±7,71 сек. ( $p < 0,05$ ). Время иммобилизации уменьшилось ( $p < 0,05$ ) на 7-ой и 21-ый день эксперимента. Уменьшение времени, проведенного в пассивном плавании и времени иммобилизации, обычно считается признаком уменьшения депрессивного поведения у крыс [4].

Также учитывались такие поведенческие параметры как груминг и дефекация, характеризующие эмоциональность животных.

После введения экстракта *Cirsium arvense* количество актов груминга и фекальных болюсов у крыс незначительно уменьшилось, что дополнительно указывает на снижение уровня тревожности и депрессивно-подобного состояния животных.

У самцов опытной группы достоверно выше было количество отряхиваний, то есть попыток освобождения от воды, что свидетельствует об улучшении общего эмоционального состояния и низком уровне депрессии у животных.

Индекс депрессивности после введения экстракта *Cirsium arvense* к 21-му дню эксперимента достоверно снижался с 1,36 до 0,24 ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, *Cirsium arvense* благотворно влияет на психоэмоциональный статус крыс линии WAG/Rij. Это, возможно, связано с наличием флавоноидов и аминокислот в составе изучаемого растения, обладающих анксиолитическим свойством [7].

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Свидетельство об официальной регистрации базы данных №. 2024622992. Оценка влияния перорального введения экстракта бодяка полевого *Cirsium arvense* L. на поведенческие реакции крыс линии WAG/Rij / Киреева И.И., Садртдинова И.И., Фархутдинов Р.Г. (RU). Зарегистрировано в Реестре баз данных от 09.06.2024.

2. Батурин В.А., Манжикова Г.И. Ритмическая организация принудительного плавания и ее связь с особенностями поведения крыс // Журн. высшей нерв. деят. 1988. Т.37, № 2. С. 293–297.

3. Морозова И.М. Лекарственные растения: методические рекомендации. – Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2013. 47 с.

4. Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р. Исследование поведения крыс линии WAG/Rij с учетом полового фактора // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2014. № 2. С. 62–66.

5. Сайбель О.Л. Принцип комплексного использования растительного сырья как инструмент ресурсосберегающих технологий получения лечебных и профилактических технологий получения лечебных и профилактических средств // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021. № 12.

6. Севастьянова Т.В. Фармакологическая характеристика седативных препаратов // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия Медицина. 2006. № 13. 738 С.

7. Шамсутдинова С.Р. Фармакогностическое изучение бодяка полевого из флоры Башкортостана: специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»: Диссертация на соискание кандидата технических наук; Башкирский Государственный Медицинский Университет. Уфа, 2022. 185 с.

8. Liebig J. Ueber die Zersetzung des Alkohols durch Chlor. Ann Pharmacother. 1832. 1: 31–32. 2. Campos KR, Coleman PJ, Alvarez JC, Dreher SD, Garbaccio RM, Terrett NK, et al. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery // Nat Chem. 2018. Vol. 10. P. 383–94.

9. Всемирная организация здравоохранения. Текст: электронный. – URL: <https://www.who.int/ru/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide> (дата обращения 15.05.2024).

© Киреева И.И., Садртдинова И.И., Фархутдинов Р.Г., 2024

## **НЕЙРОНЫ ПОЯСНОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ**

Климуть Т.В. \*, Заерко А.В.

УО Гродненский государственный медицинский университет,  
г. Гродно, Беларусь

\* klimuts@yandex.ru

Исследование влияния холестаза на нейроны поясной коры мозга крысы позволяет понять механизмы неврологических нарушений при этой патологии. Цель. Изучить микроскопические изменения нейронов поясной коры 2-го мелкоклеточного и 5-го крупноклеточного слоев поясной коры мозга крысы при холестазе. Материалы и методы. Гистологические, иммуногистохимические, морфометрические, статистические. Результаты. По мере развития холестаза в поясной коре происходит постепенное уменьшение размеров нейронов и их ядер, увеличение числа патологических форм нейронов. После перерезки ОЖП у крыс, в динамике холестаза, в нейронах мелкоклеточного и крупноклеточного слоя поясной коры активируются механизмы восстановления и репарации, так в них уменьшается иммунореактивность АТФ-синтазы и ХАТ, а также волнообразно изменяется экспрессия нейроглобина. Эти нарушения появляются на 2-5 сутки после операции, достигают максимума на 10-20 сутки, а затем постепенно нормализуются к 90 суткам.

**Ключевые слова:** крысы, мозг, поясная кора, нейроны, холестаз

## **NEURONS OF THE CINGULATE CORTEX OF THE RAT BRAIN WITH CHOLESTASIS**

Klimut T.V. \*, Zaerko A.V.

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

\* klimuts@yandex.ru

The study of the effect of cholestasis on neurons of the rat cingulate cortex allows us to understand the mechanisms of neurological disturbances under this pathology. Aim. To study changes in neurons of the cingulate cortex of the 2nd parvocellular and 5th magnocellular layers of the cingulate cortex of the rat brain during cholestasis. Materials and methods. Histological, immunohistochemical, morphometric, statistical. Results. As cholestasis develops in the cingulate cortex, there is a gradual decrease in the size of neurons and their nuclei, and an increase in the number of pathological forms of neurons. After CBD transection in rats, in the dynamics of cholestasis, various recovery and repair mechanisms are activated in the neurons of the small and large cell layers of the cingulate cortex, so the immunoreactivity of ATP synthase and ChAT decreases in them, and the expression of neuroglobin changes in waves. These disturbances appear on days 2-5 after surgery, reach a maximum on days 10-20, and then gradually normalize by 90 days.



**Keywords:** rats, brain, cingulate cortex, neurons, cholestasis

### **Актуальность**

Холестаз – нарушение оттока желчи из печени в двенадцатиперстную кишку. Это осложнение возникает при различной патологии печени и желчевыводящих путей, особенно часто при жёлчекаменной болезни, которой страдает более 10% населения планеты. Недостаточный отток желчи приводит к нарушению пищеварения (особенно жиров) в кишечнике, накоплению желчи в желчевыводящих путях, повреждению гепатоцитов и поступлению компонентов желчи (билирубин, желчные кислоты и др.) в кровь, а затем и в мозг.

В клинической практике отмечено, что холемическая интоксикация оказывают сильное угнетающее действие на ЦНС. При начальных стадиях холестаза клиницистами описаны так называемые «малые симптомы» начинающейся энцефалопатии в виде головных болей, головокружений, тяжести в голове, бессонницы ночью и сонливости днем, апатии, разбитости, невозможности длительного сосредоточения внимания, памяти. Затем могут проявляться более выраженные неврологические (психические) симптомы в виде неврастения, энцефалопатии, энцефаломиелопатии и полинейропатии. При продолжении токсикоза развиваются морфологические изменения в головном мозге, которые описаны при экспериментальном подпечёночном холестазе для неокортекса, коры мозжечка и гистаминергических нейронов гипоталамуса.

В обеспечении многообразных функций головного мозга принимает активное участие поясная кора его больших полушарий. Она является важной частью лимбической системы, которая отвечает за эмоции, обучение, память и её нарушения могут быть связаны с когнитивным дефицитом, депрессией, бессонницей наблюдаемыми при холестазе. Поясная кора совершенно не изучена при холестазе и её исследование поможет понять механизмы развития нейропсихических расстройств при этой патологии. Это обуславливает актуальность и важность гистологического исследования данного отдела коры мозга при холестазе и явилось целью настоящей работы.

### **Материалы и методы**

Эксперимент проводился на 144 беспородных белых крысах самцах массой  $225 \pm 25$  грамм. Контрольных и опытных животных содержали в стандартных условиях вивария. Исследование проведено в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей. Подпеченочный холестаз моделировали по методу Л.С. Кизюкевича путем перерезки общего желчного протока (ОЖП) между двумя лигатурами на 2–3 мм ниже места слияния печеночных протоков. Выбор уровня перевязки/перерезки, обусловлен тем, что перевязка выше этого уровня может не приводить к полному холестазу, а ниже него в ОЖП впадают многочисленные протоки

поджелудочной железы, перевязка которых приводит к развитию панкреатита и быстрой гибели всех животных. Животным контрольной группы проводили ложную операцию с сохранением физиологического тока желчи в двенадцатиперстную кишку. Животных контрольной и опытной группы, после усыпления в парах эфира, декапитировали на 2-е, 5-е, 10-е, 20-е, 45-е и 90-е сутки. Для исследования брали кусочки больших полушарий головного мозга, фиксировали их в жидкости Корнуа при +4°C (на ночь) для гистологического исследования и в цинк-этанол-формальдегиде при +4°C (на ночь) для иммуногистохимического исследования, а затем заключали в парафин. Фронтальные срезы толщиной 7 мкм готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Препараты окрашивали по методу Ниссля для анализа их цитоплазмы по степени хроматофилии. Для выявления содержания рибонуклеопротеинов (РНП) препараты окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по методу Эйнарсона. Для иммуногистохимического выявления маркера холинергических нейронов – холинацетилтрансферазы (ХАТ) – цитозольного белка, который является ключевым ферментом синтеза нейромедиатора ацетилхолина применяли первичные моноклональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания) – ab. 178850 (в разведении 1:1600, при +4°C, 20 ч., во влажной камере). Для иммуногистохимического выявления нейроглобина – белка, вовлеченного в поддержание газового гомеостаза клетки, применяли первичные моноклональные мышьиные антитела Anti-Ngb antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 37258) в разведении 1:600 при +4°C, экспозиция 20 ч, во влажной камере. Для определения иммунореактивности молекулярного маркера митохондрий АТФ-синтазы, применяли первичные моноклональные мышьиные антитела Anti-АТР5А antibody фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) в разведении 1:2400 при +4°C, экспозиция 20 ч, во влажной камере. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 236466).

Морфометрию нейронов проводили в мелкоклеточном (2-м) и крупноклеточном (5-м) слое поясной коры. Для анализа цитоплазмы нейронов поясной коры по степени хроматофилии подсчитывали процент нормохромных, гиперхромных, гиперхромных сморщенных, гипохромных нейронов и клеток-теней. Цитофотометрическое исследование гистохимических препаратов проводили, определяя оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов поясной коры, на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакций. Относительное содержание вещества выражали в единицах оптической плотности.

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), встроенной цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (BitFlow, США).

Данные полученные при морфометрическом исследовании обрабатывали с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows. В работе использовали описательную статистику, анализ данных проводили методами непараметрической статистики. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ( $p < 0,05$ ; где  $p$  – критическое значение уровня значимости)..

### **Результаты и обсуждение**

На пике холестаза (на 10–20 сутки после перевязки/перерезки общего жёлчного протока) у крыс уменьшается число нейронов на единицу площади мелкоклеточного и крупноклеточного слоев поясной коры. После перерезки ОЖП по мере развития холестаза в поясной коре происходит постепенное уменьшение размеров нейронов и их ядер, которое достигает максимума на 5, 10, 20-е сутки (мелкоклеточном слое) и на 10, 20, 45-е сутки (крупноклеточном слое). Следовательно, нейроны мелкоклеточного слоя быстрее реагируют на холестаз, а сохранившиеся нейроны быстрее восстанавливаются. В дальнейшем через 45-90 суток после перерезки ОЖП происходит постепенная нормализация размеров и формы нейронов в мелкоклеточном слое поясной коры, а в крупноклеточном – через 90 суток.

У крыс с холестазом отмечается снижение числа нормохромных и увеличение числа патологических форм нейронов (гиперхромных, гиперхромных сморщенных, гипохромных и клеток-теней) в изучаемых слоях поясной коры. Эти изменения достигают максимума на 10–20 сутки после перерезки ОЖП. Возрастание количества гиперхромных нейронов свидетельствует о функциональном напряжении и гиперфункции нейронов.

Нарушения морфофункционального состояния нейронов поясной коры крыс при холестазе проявляются в снижении содержания РНК на 2-е – 20-е сутки после перерезки ОЖП в мелкоклеточном слое и на 5-45 сутки в крупноклеточном слое. Выявленное нами снижение РНК вероятно, свидетельствует о снижении синтеза белков в клетке и, как следствие, об ограничении функциональных возможностей изучаемых нейронов в условиях холестаза. У выживших животных, в сохранившихся нейронах поясной коры на 45–90-е сутки после перевязки ОЖП хроматофилия цитоплазмы и содержание в ней РНК постепенно нормализуются. Это, вероятно, связано с устранением холестаза (что подтверждается биохимическим анализом крови), в связи с прорастанием обходных желчных протоков и восстановлением оттока желчи в 12-перстную кишку. Вместе с тем, это отражает высокие адаптационные возможности выживших нейронов поясной коры.

По изученным параметрам нейроны 2-го, мелкоклеточного слоя быстрее реагируют на холестаз и быстрее нормализуются после его исчезновения, по сравнению с нейронами 5-го, крупноклеточного слоя поясной коры. Такая закономерность не была обнаружена нами ранее, в нейронах разных слоёв неокортекса [2]. Во 2-ом, мелкоклеточном слое поясной коры

холинергические нейроны составляют 70%, а в 5-ом, крупноклеточном слое 30% от всех нейронов, выявляемых по Нисслю.

На пике холестаза, на 10-е и 20-е сутки после перевязки/перерезки общего желчного протока, количество холинергических нейронов в мелкоклеточном слое поясной коры необратимо снижается на 37% и 61%. Содержание ХАТ в цитоплазме этих нейронов через 5 и 10 суток опыта снижается на 17% и 24%, а затем в сохранившихся нейронах постепенно нормализуется.

В крупноклеточном слое гибель холинергических нейронов при холестазах растянута во времени: на 5-е, 10-е, 20-е, 45-е и 90-е сутки опыта количество холинергических нейронов снижается на 12%, 38%, 37%, 44% и 45%, соответственно. Через 10, 20, 45-суток после холестаза обнаружено уменьшение содержания ХАТ в цитоплазме сохранившихся нейронов этого слоя на 29%, 16% и 11,5%, соответственно. Это указывает на особенности реакции холинергических нейронов разных слоёв поясной коры на холестаза.

При изучении нейронов 2-ого мелкоклеточного и 5-го крупноклеточного слоев поясной коры в динамике холестаза установлено, что они реагируют на холестаза снижением иммунореактивности АТФ-синтазы, что может быть связано с нарушением митохондриальных функций. При этом уменьшение экспрессии данного маркера начинается уже на 2 сутки после перерезки ОЖП, достигают максимума на 10 сутки во 2-ом слое и на 20-е сутки в 5-ом, а затем постепенно нормализуются к 90 суткам. Это, по-видимому, связано с адаптацией нейронов к стрессу и повреждению. Известно, что после травмы клетки могут переходить в состояние энергетической экономии, снижая потребность в АТФ и, соответственно, активность АТФ-синтазы [1]. Возвращение уровня АТФ-синтазы к норме на 90-е сутки может указывать на восстановление нормальной функции в нейронах.

В нейронах 2-го, мелкоклеточного и 5-го, крупноклеточного слоев поясной коры мозга крысы изменение иммунореактивности нейроглобина носит волнообразный характер. Причем экспрессия данного маркера после перерезки ОЖП возрастает в мелкоклеточном слое на 5-е и 10-е сутки, а в крупноклеточном на 10-е и 20-е сутки. Далее в динамике холестаза иммунореактивность нейроглобина снижается в мелкоклеточном слое начиная с 20-х, а в крупноклеточном с 45-х суток. К 90-м суткам данный показатель близок к контрольным значениям в обоих слоях. Отмеченное нами повышение уровня нейроглобина в нейронах поясной коры в первые дни после перерезки ОЖП может быть связано с попыткой клеток поддержать высокий уровень кислорода и защититься от повреждений. Это увеличение может отражать активацию нейропротекторных механизмов, таких как подавление митохондриальных факторов апоптоза [3]. Описано, что сверхэкспрессия *Ngb* защищает нейроны от гипоксии/ишемии, а снижение экспрессии *Ngb* увеличивает гипоксическое повреждение нейронов. Поэтому описанное нами дальнейшее снижение уровня нейроглобина в отдаленные сроки холестаза может свидетельствовать о повреждении нейронов поясной коры. Тот факт, что к 90-м суткам данный

показатель близок к контрольным значениям в обоих слоях может указывать на постепенное возвращение выживших нейронов к нормальной функции и стабилизацию их состояния.

### Список литературы

1. Васюкова О.В. и др. Энергетический обмен человека: как мы можем персонифицировать терапию ожирения // Проблемы эндокринологии. 2021. Т. 67. № 5. С. 4-10. Doi 10.14341.
2. Зиматкин С.М., Емельянчик С.В. Нейроны мозга при нарушениях циркуляции желчи. Гродно: ГрГМУ, 2021, 368 с.
3. Узлова Е.В., Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Содержание нейроглобина в структурах головного мозга крысы при субтотальной ишемии ученые записки казанского университета // Серия естественные науки. 2023. Т. 165. № 2. С. 204–215 doi: 10.26907/2542-064X2023.2.204-215.

© Климуть Т.В., Заерко А.В., 2024

УДК 597.552.51: 577.115.3

## ЛИПИД СВЯЗЫВАЮЩИЙ ПРОТЕИН В ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГЕ МОЛОДИ ТИХООКЕАНСКОЙ КЕТЫ В УСЛОВИЯХ ИНТАКТНОСТИ И ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Клюка Г.Г.\* , Пущина Е.В., Капустянов И.А.

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского, г. Владивосток, Россия

\* gleb.klyuka@bk.ru

В данной работе мы исследовали экспрессию липид связывающего протеина (VLBP) в продолговатом мозге молодежи Тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta* после травматического воздействия. Травмы были нанесены в одну и ту же область продолговатого мозга, однако отличались длительностью посттравматического периода, а именно: острая (3, 7 дней) и заживающая (60 дней). Для того чтобы оценить конститутивную и посттравматическую экспрессию VLBP в продолговатом мозге, мы использовали иммунопероксидазное выявление VLBP в клетках продолговатого мозга. После, экспрессия VLBP была выявлена в клетках различных типов, в том числе: нейральных стволовых клетках предшественниках (НСКП), нейронах и глиальных клетках [1]. VLBP позитивные клетки были выявлены в перивентрикулярной и внешней субмаргинальной зоне, граничащей с мягкой мозговой оболочкой, зоне проекций IX и X пары черепномозговых нервов, а также увеличения количества клеток как в области травмы, так и увеличение одиночных клеток по всей области продолговатого мозга.

**Ключевые слова:** нейрогенез; НСКП; Кета; Продолговатый мозг; VLBP

# LIPID BINDING PROTEIN IN THE MEDULLA OBLONGATA OF JUVENILE PACIFIC CHUM SALMON UNDER CONDITIONS OF INTACTNESS AND TRAUMATIC IMPACT

Klyuka G.G. \*, Pushchina E.V., Kapustyanov I.A.

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Vladivostok, Russia

\* gleb.klyuka@bk.ru

In this paper, we investigated the expression of lipid binding protein (BL BP) in the medulla oblongata of juvenile Pacific chum salmon after traumatic. The injuries were inflicted in the same area of the medulla oblongata, but differed in the duration of the post-traumatic period, namely: acute (3, 7 days) and healing (60 days) after the injury. In order to evaluate the constitutive and posttraumatic expression of BL BP in the medulla oblongata, we used immunoperoxidase detection of BLBP in medulla oblongata cells. After that, BLBP expression was detected in various types of cells, including: neural progenitor stem cells (NSCs), neurons and glial cells [1]. BLBP positive cells were detected in the periventricular and external submarginal zone of the granulated area with a soft meninx, projection of IX and X pairs of cranial nerves, as well as an increase in the number of both in the area of injury and single cells throughout the medulla oblongata.

**Keywords:** neurogenesis; NSKP; Chum salmon; Medulla; BLBP

## Актуальность

Нейрогенез это один из важнейших процессов участвующих как в формирование нервной системы позвоночных, так и процессах её постэмбрионального развития. Однако у большинства позвоночных он выражен гораздо слабее чем у рыб [2, 3]. Основной причиной ограниченного восстановления нервной ткани является нейровоспаление и формирование астрацитарного рубца, в результате которого происходит нарушение функциональности нейрональных сетей, другой причиной является ограниченное количество нейрогенных зон [5]. Таким образом изучение экспрессии BLBP на молоди *O.keta* может дать новую информацию о процессах нейрогенеза и нейроглиогенеза в различных областях мозга.

Цель работы: определить экспрессию BLBP в клетках продолговатого мозга после травматического воздействия по сравнению с контрольным объектом, не подверженным травматическому воздействию.

## Материалы и методы

В работе были использованы 4 двухгодовалые особи молоди кеты *Oncorhynchus keta* с длиной тела 20–27,1 см и массой 77,1–106 г. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2021 г. Молодь кеты содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением за сутки. Соотношение светового и темного периодов

в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде – 7–10 мг/дм<sup>3</sup>, что соответствует нормальному насыщению.

Рыбы были анестезированы в растворе трикаин метансульфоната MS222 (Sigma, США) в течение 10–15 мин. После анестезии внутричерепную полость обездвиженного животного перфузировали с помощью шприца 4%-ым раствором параформальдегида, приготовленным на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2). После 30 мин префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 2 ч при 4°C. Затем в течение двух суток выдерживали в 30% растворе сахарозы при 4°C с пятикратной сменой раствора. Серийные фронтальные срезы мозга кеты толщиной 50 мкм готовили на замораживающем микротоме Cryo-Star HM 560 MV (Германия), монтировали на желатинизированные предметные стекла и высушивали.

Экспериментальное повреждение мозга.

Экспериментальное повреждение среднего мозга проводили путем прокалывания черепа рыбы тонкой стерильной иглой. В левую часть продолговатого мозга за мозжечком наносили рану глубиной в 3 мм. После механического повреждения, животных выпускали в аквариум для их восстановления и дальнейшего мониторинга.

Иммуногистохимия.

В работе был использован маркер характерный для нейральных стволовых клетках предшественников (НСКП), нейронах и глиальных клетках BLBP (Brain lipid binding protein) [5]. Для оценки экспрессии (BLBP) после повреждения (3, 7) и заживающей (60 дней) травмы. Для оценки экспрессии липид связывающего протеина (BLBP) использовали иммунопероксидазный метод. В качестве антител использовались моноклональные антитела против (BLBP) фирмы Abcam (ab110099) (Великобритания) в разведении 1:300.

Для визуализации ИГХ маркирования использовали стандартный ABC комплекс Vectastain Elite ABC kit («Vector Laboratories», США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для выявления продуктов реакции применялся субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, «Vector Labs», Burlingame, США) в сочетании с докрашиванием метиловым-зеленым по Браше (Меркулов, 1969). Развитие ИГХ окраски контролировали под микроскопом. Материал обезвоживали по стандартной процедуре в двух сменах этилового спирта (96%), проводили через ксилол и заключали в среду для гистологических препаратов Bio-Optica (Италия).

Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Срезы мозга вместо первичных антител инкубировали с 1%-ым раствором неиммунной сыворотки лошади в течение 1 сут. и обрабатывали как срезы с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

Микроскопия.

Для визуализации процессов пролиферации, нейрогенеза, глиогенеза и проведения морфологического и морфометрического анализа был использован моторизированный инвертированный микроскоп исследовательского класса Axiovert 200 M с модулем ApoTome и цифровыми камерами AxioCam MRM и AxioCamHRC (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии препаратов и анализ материала осуществляли спомощью программы AxioVision. Измерения проводили при увеличении 10×, 20× и 40× в нескольких случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования. Микрофотографии препаратов получали с помощью цифровой камеры Axiovert 200. Обработка материала проводилась с использованием программы Axiovision.

Статистическая обработка.

Количественная обработка материала выполнялась с помощью программы «Описательная статистика» Microsoft Excel 2010. Плотность распределения и размерные характеристики клеток оценивались с помощью методов вариационной статистики. Для количественной оценки результатов находились среднее значение и стандартное отклонение для большого и малого диаметров клетки. Подсчет клеток проводился на профильное поле при увеличении ×20.

### Результаты и их обсуждение

В интактном состоянии мы наблюдали небольшое количество VLBП иммунопозитивных клеток (6 шт) в перивентрикулярной области IV желудочка и в дорсолатеральной зоне от медиального продольного пучка (МПП) (рис. 1А). В результате анализа было выявлено несколько типов клеток, отличающихся морфологическими характеристиками, а также топографической локализацией в продолговатом мозге.

Таблица 1.

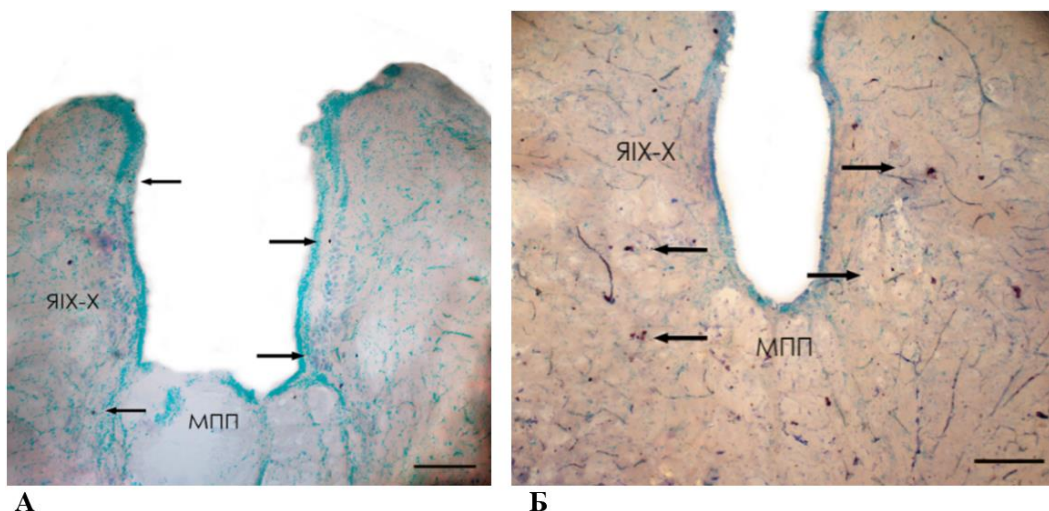
Морфологическая характеристика и типы клеток VLBП позитивных клеток в продолговатом мозге *O.keta* после травматического воздействия и в интактном состоянии

Травма		Контроль	
Размеры клеток (мкм)	Суммарное количество (шт)	Размеры клеток (мкм)	Суммарное количество (шт)
8±0,9/4±1,7 (I)	24	8,6±/7,6± (I)	6
8±1,2/6±0,4 (II)	3		
6±1/6±1,1 (III)	11		

*Примечание.* Римскими цифрами в скобках указан тип клеток. I – сильно окрашенные овальной формы, II – слабо окрашенные овальной формы, III – сильно окрашенные круглой формы.

В результате острой травмы продолговатого мозга молодежи кеты количество VLBП-ип клеток различных типов возросло в ≈ 6 раз (рис. 1Б, табл. 1А). Мы наблюдали отдельные VLBП-ип в области четвертого желудочка, IX и X пары черепномозговых нервов, вблизи внешней зоны, а также отдельные клетки по всей области продолговатого мозга. (рис. 1Б).





**А** **Б**  
 Рис. 1. Иммуногистохимическое маркирование VLBP в области продолговатого мозга молодежи *O.keta*: А – в интактное состояние. Б – через 3 дня после травматического повреждения. Масштабный отрезок 200 мкм

Таким образом, полученные результаты показывают возможное наличие регенеративного потенциала в области четвертого желудочка, а также IX и X пары черепно-мозговых нервов. Потенциальное наличие клеток НСКП подтверждает сохранение признаков фетальной организации [4] в большинстве областей мозга в течение первых двух лет жизни *O.keta*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Diotel N., Vaillant C., Gueguen M.M., Mironov S., Anglade I., Servili A., Pellegrini E., Kah O. Cxcr4 and Cxcl12 expression in radial glial cells of the brain of adult zebrafish. *J Comp Neurol.* 2010 Dec 15;518(24):4855-76. doi: 10.1002/cne.22492. PMID: 21031556.
2. Diotel N. Lübke L. Strähle, U. Rastegar S. Common and Distinct Features of Adult Neurogenesis and Regeneration in the Telencephalon of Zebrafish and Mammals // *Front. Neurosci.* 2020. 14. 568930.
3. Shimazaki T. Vertebrate Neural Stem Cells: Development, Plasticity and Regeneration. *Keio J. // Med.* 2016. Vol. 265. Pp. 1–15.
4. Структура, хемоархитектоника и постэмбриональный гистогенез ЦНС рыб: автореферат дис. ... доктора биологических наук: 03.03.04 / Пуцина Евгения Владиславовна; [Место защиты: Ин-т биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН]. Владивосток, 2012. 47 с.
5. Lindsay C. McDermott, Judith Storch, Proteins and Disease | Structural Insight and Functional Diversity of Mammalian Fatty Acid Binding Proteins in Health and Disease, Editor(s): Joseph Jez, *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)*, Elsevier, 2021, Pp. 63–76.

© Клюка Г.Г., Пуцина Е.В., Капустянов И.А., 2024

## **КОННЕКСИН-43 В КЛЕТКАХ СПИННОМОЗГОВОГО ГАНГЛИЯ ЭМБРИОНОВ КРЫСЫ**

Колос Е.А.\* , Бекетова А.А., Яковлев В.С.

Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург, Россия

\* koloselena1984@yandex.ru

Взаимодействия глиальных клеток, а также взаимодействия нейронов и глии имеют решающее значение для развития нервной системы. Одной из структур, обеспечивающих коммуникации клеток в эмбриогенезе являются коннексин-содержащие щелевые контакты. Целью настоящей работы явилось исследование распределения коннексина-43 в клетках спинномозгового ганглия крысы в период эмбрионального развития. С использованием иммуногистохимического выявления Сх43 установлено, что в период с 18 по 20 сут пренатального развития изучаемый белок присутствует в следующих клетках спинномозгового ганглия крысы: в развивающихся клетках-сателлитах, в нейрональных клетках-предшественниках, находящихся в состоянии митотического деления или апоптоза.

**Ключевые слова:** спинномозговой ганглий, эмбриогенез, коннексин-43, апоптоз, иммуногистохимия

## **CONNEXIN-43 IN THE DORSAL ROOT GANGLION CELLS OF RAT EMBRYOS**

Kolos E.A.\* , Beketova A.A., Yakovlev V.S.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

\* koloselena1984@yandex.ru

Glial cell interactions as well as neuron-glia interactions are critical for the development of the nervous system. One of the structures that ensure cell communication in embryogenesis are connexin-containing gap junctions. The purpose of this work was to study the distribution of connexin-43 in rat dorsal root ganglion cells during embryonic development. Using immunohistochemical detection of Cx43, it was established that in the period from 18 to 20 days of prenatal development, the studied protein is present in developing satellite glial cells, in neuronal precursors in a state of mitotic division or apoptosis.

**Keywords:** dorsal root ganglion, embryogenesis, connexin-43, apoptosis, immunohistochemistry

### **Актуальность**

Нейроны спинномозгового ганглия (СМГ) и окружающие их глиальные клетки обеспечивают передачу сенсорной информации от периферических органов в высшие сенсорные центры нервной системы. Именно эти пути обеспечивают восприятие сенсорной информации от внешних

раздражителей, оценку ее интенсивности и типа, а также последующую двигательную активность. Как известно, взаимодействия глиальных клеток между собой, а также взаимодействия нейронов и глиоцитов имеют решающее значение для развития нервной системы [1-3]. До настоящего момента не ясно, каким образом клетки-предшественники нейрональной и глиальной популяции взаимодействуют друг с другом во время пренатального развития, обеспечивая формирование функционального ганглия периферической нервной системы и участвуя в установлении связей между спинным мозгом и спинномозговым ганглием. Выполненное ранее исследование [4] показало, что в СМГ взрослых крыс межклеточные коммуникации осуществляются за счет щелевых контактов с участием белка Сх43. При этом в литературе практически отсутствуют данные о распределении коннексин-содержащих структур в развивающейся ПНС.

Целью настоящей работы явилось исследование распределения коннексина-43 в клетках спинномозгового ганглия крысы в период эмбрионального развития.

#### **Материалы и методы**

Работа выполнена на эмбрионах крыс Вистар 18–20 сут развития (E18–E20) ( $n = 15$ ). Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). У эмбрионов крыс выделяли спинной мозг с соответствующими спинномозговыми ганглиями на уровне  $C_{III}$ – $C_V$  сегмента спинного мозга. Полученный материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида, затем обезвоживали в спиртах и заливали в парафин. Для исследования изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм. На полученных срезах проводили иммуногистохимическую реакцию на белок коннексин-43 с применением мышинных моноклональных антител (клон F-7, разведение 1:600, Santa Cruze Biotechnology, США) в качестве вторичных антител был использован набор UltraVision Quanto Detection System HRP (TL-060-QH; Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением нормальной крысиной сыворотки, полученной от крыс породы Вистар (ФГБНУ «ИЭМ»). Полученные препараты исследовали с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия). Микрофотографии получали с применением камеры ICC50 (Leica, Германия) и программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия).

#### **Результаты и обсуждение**

В настоящей работе исследовали СМГ эмбрионов крыс с E18 по E20. Выбор сроков пренатального развития связан с тем, что, начиная с E18 СМГ приобретают структуру, свойственную им в постнатальный период. Начиная с 18-х сут эмбриогенеза развивающиеся нейрональные и глиальные элементы имеют свойственную им морфологию и легко различимы на препаратах, окрашенных толуидиновым синим по Ниссю. СМГ крыс E18–E20 содержат нейробласты и молодые нейроны и клетки-сателлиты.

Клетки-сателлиты ганглия располагаются вокруг крупных округлых нервных клеток и приобретают форму полумесяца. С E18 клетки-сателлиты начинают экспрессировать свойственный им ИГХ-маркер – глутаминсинтетазу [5]. На последующие сутки развития (E19–20) глутаминсинтетаза-иммунопозитивные клетки-сателлиты ганглия располагаются вокруг формирующихся нейронов СМГ, что характерно для ганглия взрослой крысы. Установлено, что в эти сроки только клетки-сателлиты, но не нейробласты, экспрессируют Сх43. После 18 сут эмбрионального развития коннексин-43 локализуется в небольшом участке цитоплазмы клеток-сателлитов. Так как коннексин-43 обладает функциями регуляции морфологии клеток, роста и реорганизации отростков [6, 7], можно предположить, что скопление белка в определенном локусе цитоплазмы клеток-сателлитов обусловлено его участием в процессе формирования глиальной оболочки нейронов и в приобретении сателлитами морфологических особенностей, обеспечивающих их функции. Немногочисленные точечные коннексин-43-иммунопозитивные структуры, выявленные нами на поздних сроках эмбриогенеза в области формирующихся выростов цитоплазмы клеток-сателлитов, окружающих тела молодых нейронов, соответствуют по морфологии и локализации бляшкам щелевых контактов, обеспечивающим коммуникации клеток глиальной оболочки одного нейрона [4].

Показано, что большинство нейробластов и молодых нейронов в изученные сроки развития не экспрессируют коннексин-43. Однако при проведении иммуногистохимического выявления коннексина-43, были обнаружены единичные нейрональные клетки с диффузным окрашиванием цитоплазмы и признаками дегенерации. Такие клетки имели признаки апоптотных изменений (пикнотичное или фрагментированное ядро). В исследованиях, выполненных на культурах клеток, высказывается предположение о роли коннексинов в механизмах клеточной гибели не посредством своей канальной активности, а посредством прямой или косвенной регуляции транскрипционных программ и путей апоптоза [8–10]. Однако стоит отметить, что роль коннексина-43 в процессах гибели и выживании нейронов не вполне определена, имеющиеся в литературе данные противоречивы. В частности, показано, что ранние фазы апоптоза требуют высокого уровня коннексинов, в то время как апоптотные тельца не содержат коннексин [9]. Можно предположить, что идентифицированные в настоящем исследовании Сх43-иммунопозитивные нейробласты находятся на начальных стадиях программированной клеточной гибели.

В настоящем исследовании было также отмечено, что отдельные митотически делящиеся клетки-предшественники содержат Сх43. В таких клетках белок распределен равномерно в цитоплазме. Аналогичные гистологические картины были описаны ранее с использованием иммунофлуоресцентного выявления белка в исследованиях, выполненных на опухолевых клетках [11]. Показано, что щелевые контакты исчезают

с клеточной поверхности во время клеточного деления. Механизм, регулирующий изменение щелевых контактов во время митоза, неясен.

В настоящем исследовании показано, что в клетках оболочек ганглия идентифицируются отдельные коннексин-43-содержащие бляшки щелевых контактов. Данные клетки являются клетками-предшественниками периневрия [12, 13].

### **Заключение**

В настоящем исследовании было изучено распределение коннексина-43 в клетках спинномозгового ганглия крыс в период с 18-ых по 20-ые сутки пренатального развития. В эти сроки эмбриогенеза коннексин-43 присутствует лишь в сателлитной глии. В цитоплазме чувствительных нейронов, не имеющих признаков дегенерации, коннексин-43 не определяется. Установлено, что Cx43 экспрессируется также в митотически делящихся клетках-предшественниках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-10003, <https://rscf.ru/project/23-25-10003/>) и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 05.05.2023 г. № 23-25-10003.

Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 4/22 от 29.09.2022).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Elias L.A., Wang D.D., Kriegstein A.R. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex // *Nature*. 2007. Vol. 448. № 7156. P. 901–907.
2. Allen N.J., Lyons D.A. Glia as architects of central nervous system formation and function // *Science*. 2018. Vol. 362. № 6411. P. 181–185.
3. Kim Y.S., Choi J., Yoon B.-E. Neuron-glia interactions in neurodevelopmental disorders // *Cells*. 2020. Vol. 9. P. 2176.
4. Kolos E.A., Korzhevsky D.E. Gap junction protein connexin-43 in a rat dorsal root ganglion // *Cell and Tissue Biology*. 2024. Т. 18. № 2. С. 189–198.
5. Kolos E.A., Korzhevskii D.E. Glutamine synthetase-containing cells of the dorsal root ganglion at different stages of rat ontogeny // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018. Vol. 49. № 3. P. 179–183.
6. Bates D.C., Sin W.C., Aftab Q., Naus C.C. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus // *Glia*. 2007. Vol. 55. № 15. P.1554–1564.
7. Olk S., Turchinovich A., Grzendowski M. et al. Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration // *Glia*. 2010. Vol. 58. № 4. P. 494–505.
8. Kalvelyte A., Imbrasaitė A., Bukauskiene A. et al. Connexins and apoptotic transformation // *Biochemical pharmacology*. 2003. Vol. 66. № 8. P. 1661–1672.

9. Decrock E., Vinken M., De Vuyst E. et al. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? // *Cell Death Differ.* 2009. Vol. 16. № 4. P. 524–536.
10. Belousov A.B., Fontes J.D., Freitas-Andrade M., Naus C.C. Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease // *BMC Cell Biol.* 2017. Vol. 18. № 1. P. 4.
11. Vanderpuye O.A., Bell C.L., Murray S.A. Redistribution of connexin 43 during cell division // *Cell Biol. Int.* 2016. Vol. 40. № 4. P. 387–396.
12. Nagaoka T., Oyamada M., Okajima S., Takamatsu T. Differential expression of gap junction proteins connexin26, 32, and 43 in normal and crush-injured rat sciatic nerves. Close relationship between connexin43 and occludin in the perineurium // *J. Histochem Cytochem.* 1999. Vol. 47. № 7. P. 937–948.
13. Petrova E.S., Kolos E.A. Current views on perineurial cells: unique origin, structure, functions // *J. Evol. Biochem. Phys.* 2022. Vol. 58. P. 1–23.

© Колос Е.А. \*, Бекетова А.А., Яковлев В.С., 2024

УДК 612.282; 612.216.2

### **РОЛЬ P2-РЕЦЕПТОРОВ РЕТРОТРАПЕЦИЕВИДНОГО ЯДРА В РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ У КРЫС**

Конашенкова А.Т. \*, Ведясова О.А., Павленко С.И.

Самарский национальный исследовательский университет  
им. академика С.П. Королева, г. Самара, Россия

\* konashenkova.an@gmail.com

С целью уточнения вклада нейромедиаторных механизмов в деятельность респираторной нейросети были изучены изменения внешнего дыхания и электроактивности диафрагмальной мышцы на микроинъекции АТФ, как агониста пуриновых рецепторов подтипа P2, в ретротрапециевидное ядро (РТЯ) у крыс. Микроинъекции АТФ (0,2 мкл;  $10^{-7}$  М) в РТЯ усиливали легочную вентиляцию, за счет роста частоты и глубины дыхания, и стимулировали активность диафрагмы, что проявлялось уменьшением длительности инспираторных залпов и межзалповых интервалов на электромиограммах. Наблюдаемые респираторные эффекты свидетельствуют стимулирующем влиянии пуринергической системы на ритм и паттерн дыхания и указывают на участие в реализации этого влияния P2-рецепторов области РТЯ.

**Ключевые слова:** ретротрапециевидное ядро, P2-рецепторы, АТФ, микроинъекции, регуляция дыхания

## **THE ROLE OF P2 RECEPTORS OF THE RETROTRAPEZOID NUCLEUS IN THE REGULATION OF RESPIRATION IN RATS**

Konashenkova A.T. \*, Vedyasova O.A., Pavlenko S.I.  
Samara National Research University, Samara, Russia  
\* konashenkova.an@gmail.com

In order to clarify the contribution of neuromediator mechanisms to the activity of the respiratory neural network, changes in external respiration and electrical activity of the diaphragmatic muscle were studied upon microinjection of ATP, an agonist of purinergic receptors of the P2 subtype, into the retrotrapezoid nucleus (RTN) in rats. Microinjections of ATP (0,2 microliter;  $10^{-7}$  M) increased pulmonary ventilation due to an increase in the respiratory rate and tidal volume, and stimulated the activity of the diaphragm, which was manifested by a shortening of inspiratory bursts and interburts intervals on electromyograms. In general, the observed respiratory effects indicate the stimulating influence of the purinergic system on the rhythm and pattern of breathing and indicate the participation of the RTN region P2-receptors in the implementation of this effect.

**Keywords:** retrotrapezoid nucleus, P2-receptors, ATP, microinjections, respiratory control

### **Актуальность**

В настоящее время среди структур нейронной респираторной сети повышенный интерес вызывает ретротрапециевидное ядро (РТЯ), которое участвует в регуляции дыхательного ритма и рассматривается как центр хеморецепции [1]. Особая роль РТЯ в регуляции дыхания подтверждается тем, что при его поражении у животных практически полностью нарушается центральный респираторный хеморефлекс [2], а у человека возникает врожденный центральный гиповентиляционный синдром [3]. Установлено, что деятельность РТЯ регулируется широким спектром нейромедиаторных стимулов, благодаря которым достигается нормальный уровень его функционирования [4]. В последние годы в литературе обсуждается вопрос об участии в регуляции респираторной активности РТЯ пуринергических механизмов, что актуально в аспекте возможного использования пуриновых рецепторов в качестве мишеней лекарственных препаратов при фатальных нарушениях дыхания [5]. Высказано предположение, что пуринергическая система в РТЯ представлена P1 и P2 типами пуриновых рецепторов [4], среди которых роль именно P2-рецепторов изучена недостаточно.

Цель нашей работы заключалась в анализе роли P2-рецепторов РТЯ в регуляции паттерна и ритма дыхания у крыс.

### **Материалы и методы**

Исследование выполнено на взрослых нелинейных крысах массой 180–250 г, наркотизированных уретаном (в/б; 1,6 г/кг). В ходе операционной подготовки проводили трахеостомию, открывали доступ к одному из куполов диафрагмальной мышцы, обнажали поверхность черепа

и высверливали в нем отверстие для микроинъекций. По стереотаксическим координатам [2] через трепанационное отверстие вводили в РТЯ микроканюлю (диаметр кончика 50 мкм), закрепленную на игле микрошприца («Hamilton», США). Экспериментальным животным (n = 7) делали микроинъекции раствора АТФ (аденозинтрифосфата динатриевая соль, «Silko Research Laboratories», Индия) в концентрации  $10^{-7}$  Моль и объеме 0,2 мкл. Контрольным крысам (n = 6) вводили искусственную спинномозговую жидкость.

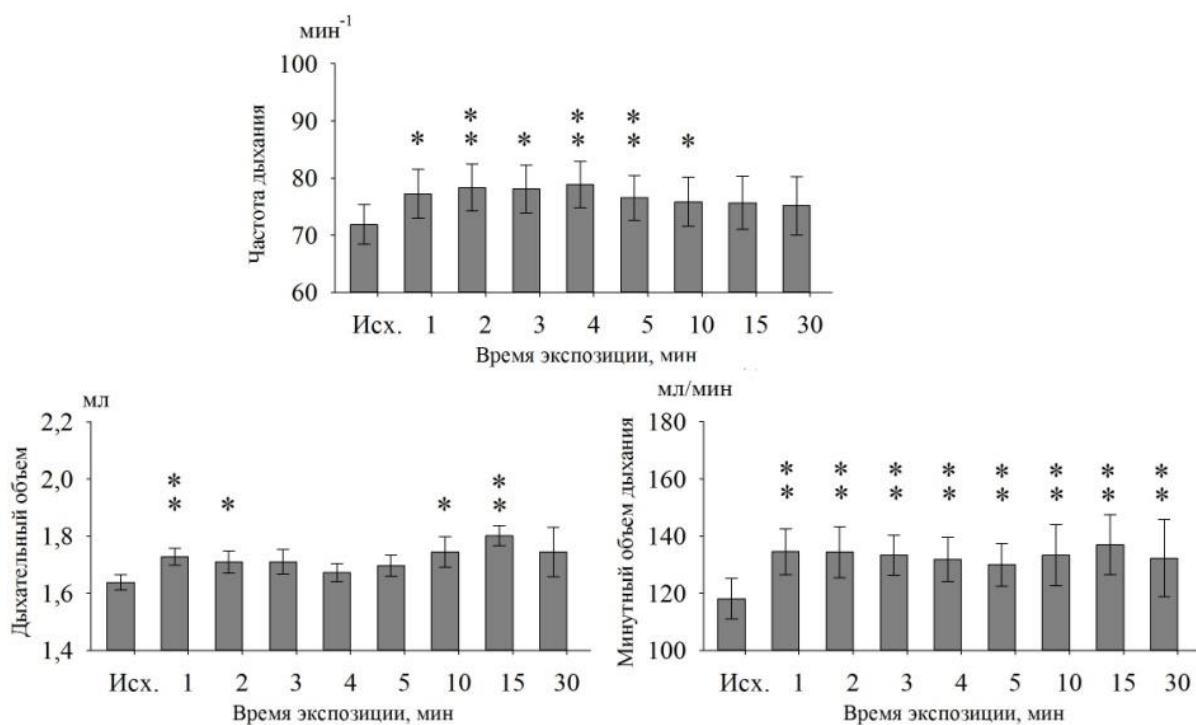
Регистрировали внешнее дыхание с помощью миниатюрного спирографа, соединенного с трахеостомической трубкой, и суммарную электромиограмму (ЭМГ) диафрагмальной мышцы, отводимую биполярными игольчатыми электродами, соединенными с миографом. Запись велась до и в течение 30 минут после микроинъекций. С помощью программы PowerGraph 3.3 Professional (ООО «Интероптика-С», Россия) на спирограммах анализировали длительность вдоха (с) и выдоха (с), дыхательный объем (мл), частоту дыхания (ЧД, мин<sup>-1</sup>), минутный объем дыхания (мл/мин), объемную скорость инспираторного потока (мл/с). На ЭМГ диафрагмы оценивали длительность инспираторных залпов (с) и межзалповых интервалов (с), амплитуду осцилляций в залпах (усл. ед.).

Статистическую обработку проводили с помощью программы SigmaPlot 12.5. Для определения нормальности распределения данных применяли тест Шапиро-Уилка, для сравнения показателей с исходным уровнем и контролем использовали тесты Стьюдента. Коэффициент корреляции рассчитывали по Спирману. Результаты представлены как среднее значение ± ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и обсуждение**

Согласно полученным данным, введение АТФ в РТЯ вызывало у крыс изменения частотных и объемных параметров паттерна внешнего дыхания, что в итоге выражалось в усилении легочной вентиляции. Во-первых, микроинъекции АТФ меняли фазовую структуру дыхательного цикла. Так, с 1 по 30 мин экспозиции уменьшалась длительность вдоха относительно исходного уровня (9,3%;  $p < 0,05$ ) и контроля ( $p < 0,01$ ). Выдох также укорачивался, но с большей выраженностью с 1 по 5 мин регистрации (8,5%;  $p < 0,05$ ). На фоне изменений вдоха и выдоха наблюдалось закономерное увеличение частоты дыхания с 1 по 10 мин в среднем на 9,7% ( $p < 0,01$ ) от исходного уровня (рис. 1).

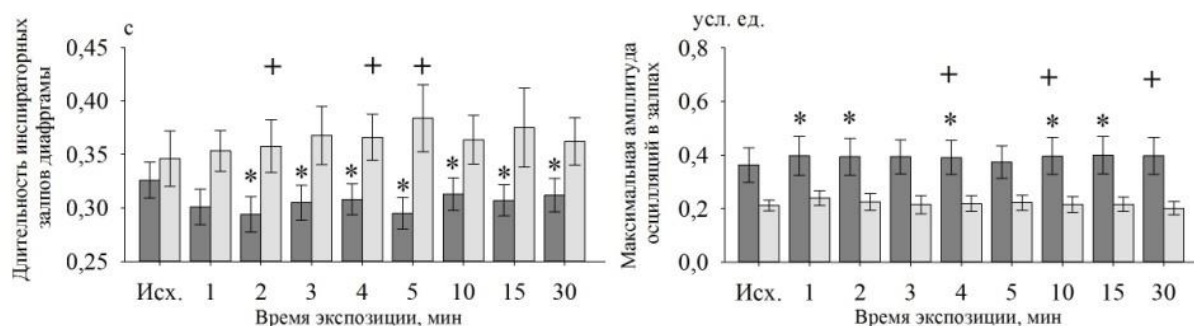




*Рис. 1.* Изменение параметров внешнего дыхания после микроинъекций АТФ в РТЯ у крыс. Обозначения: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) – статистически значимые различия с исходным уровнем

Во-вторых, микроинъекции АТФ в РТЯ сопровождались выраженным приростом объемных параметров паттерна дыхания. Так, дыхательный объем значимо ( $p < 0,01$ ) менялся в первой половине экспозиции, нарастая от  $1,64 \pm 0,03$  мл в исходном состоянии до  $1,80 \pm 0,03$  мл на 15 мин после микроинъекции. В те же сроки выражено увеличивалась объемная скорость инспираторного потока (от  $6,74 \pm 0,38$  мл/с до  $8,01 \pm 0,44$  мл/с), что было на 19,3% ( $p < 0,01$ ) выше исходного фона и статистически значимо ( $p < 0,01$ ) превышало динамику данного показателя в контроле. Изменения частотных и объемных параметров спирограммы обусловили увеличение минутного объема дыхания, достигавшее 15,6% ( $p < 0,01$ ) от исходной величины на 15-й мин записи (рис. 1). Важно, что наблюдаемые изменения более чем на 50% превышали контрольные значения ( $p < 0,05$ ).

Характерной реакцией диафрагмальной мышцы на микроинъекции АТФ в РТЯ было уменьшение длительности инспираторных залпов и межзалповых интервалов на ЭМГ в среднем на 9,4% ( $p < 0,05$ ). Рост амплитуды осцилляций в залпах диафрагмальной активности составлял 10,9% от исходного уровня ( $p < 0,05$ ) и наблюдался в течение всей регистрации (рис. 2).



*Рис. 2.* Изменение параметров ЭМГ диафрагмальной мышцы после микроинъекций АТФ в РТЯ. Обозначения: серые столбики – опыт, белые – контроль; \*( $p < 0,05$ ) – различия с исходным уровнем, +( $p < 0,05$ ) – различия с контролем

Следует отметить, что реакции диафрагмальной мышцы определенным образом коррелировали с изменениями паттерна внешнего дыхания. Была выявлена положительная корреляционная связь между уменьшением длительности инспираторных залпов и фазы вдоха ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,05$ ), а также между межзалповыми интервалами и выдохом ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,05$ ). Наблюдаемые изменения амплитуды ЭМГ положительно коррелировали с увеличением дыхательного объема ( $r = 0,78$ ;  $p < 0,05$ ).

Таким образом, микроинъекции АТФ в РТЯ вызывают у крыс усиление внешнего дыхания и диафрагмальной активности, что указывает на участие пуринаргической системы изучаемого ядра в стимуляции механизмов, обеспечивающих формирование ритма и паттерна дыхания. Реакции, наблюдаемые при воздействии раствора АТФ на РТЯ, допустимо связывать с активацией разных классов P2-рецепторов. По некоторым данным, наиболее вероятной мишенью для АТФ в РТЯ являются P2Y-рецепторы, которые в значительной степени вовлечены в реализацию центрального дыхательного хеморефлекса [4]. В то же время не следует исключать роль P2X-рецепторов РТЯ [6], которые имеют астроцитарную и нейрональную локализацию [5, 7]. P2X-рецепторы могут активироваться небольшими концентрациями АТФ и более широко, чем P2Y-рецепторы, представлены в ЦНС, и именно с поражениями этих рецепторов ассоциированы многие нейродегенеративные заболевания [8]. Уточнение мембранно-рецепторных механизмов реализации респираторных эффектов АТФ в области РТЯ может составить предмет дальнейших исследований в рамках решения проблемы центральных механизмов регуляции дыхания и их нарушений у человека.

Исследование выполнено с соблюдением норм биоэтики (протокол № 3 заседания комиссии по биоэтике биологического факультета Самарского университета от 10.09.2023).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

1. Guyenet P.G., Bayliss D.A., Stornetta R.L., et al. Proton detection and breathing regulation by the retrotrapezoid nucleus // *Journal of Physiology*. 2016. Vol. 594. No. 6. Pp. 1529–1551.
2. Souza G., Stornetta R.L., Stornetta D.S., et. al. Contribution of the retrotrapezoid nucleus and carotid bodies to hypercapnia- and hypoxia-induced arousal from sleep // *Journal of Neuroscience*. 2019. Vol. 39. No. 49. Pp. 9725–9735.
3. Meylemans A., Depuydt P., De Baere E., et. al. Adult-onset congenital central hypoventilation syndrome due to PHOX2B mutation // *Acta Neurologica Belgica*. 2021. Vol. 121. No. 1. Pp. 23–35.
4. Moreira T.S., Sobrinho C.R, Falquetto B., et. al. The retrotrapezoid nucleus and the neuromodulation of breathing // *Journal of Neurophysiology*. 2021. Vol. 125. No. 3. Pp. 699–719.
5. Illes P., Ulrich H., Chen J.F., Tang Y. Purinergic receptors in cognitive disturbances // *Neurobiology of Disease*. 2023. Vol. 185. Pp. 106-229.
6. Barna B.F., Takakura A.C., Mulkey D.K., Moreira T.S. Purinergic receptor blockade in the retrotrapezoid nucleus attenuates the respiratory chemoreflexes in awake rats. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2016. Vol. 217. No. 1. Pp. 80–93.
7. Khan M.T., Deussing J., Tang Y., Illes P. Astrocytic rather than neuronal P2X7 receptors modulate the function of the tri-synaptic network in the rodent hippocampus // *Brain Research Bulletin*. 2019. Vol. 151. Pp. 164–173.
8. Andrejew R., Oliveira-Giacomelli Á., Ribeiro D.E., et al. The P2X7 receptor: central hub of brain diseases // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2020. Vol. 13. Pp. 124.

© Конашенкова А.Т., Ведясова О.А., Павленко С.И., 2024

УДК 616-092.9

## **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕРВНОЙ ТКАНИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ФАРМАКУПУНКТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛЛОГЕННЫМ БИОМАТЕРИАЛОМ В УСЛОВИЯХ ВЫНУЖДЕННОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ**

Лебедева А.И.\*, Мусина Л.А., Шангина О.Р., Галаутдинов М.Ф., Гареев Е.М.

Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения России, г. Уфа, Россия

\*Jeol02@mail.ru

Цель – выявление морфологических особенностей нервной ткани неокортекса после вынужденной физической нагрузки и акупунктурного

введения аллогенного биоматериала (БМА). В эксперименте использовались крысы-самцы. Моделями физических нагрузок явилось плавание с грузом и бег на третбане под наклоном. После 30-суточных тренировок крысам подкожно в биологически активные точки вводили суспензию БМА. Через 5 и 21 суток выводили из опыта, иссекали предцентральную извилину головного мозга для гистологических исследований. После введения БМА восстанавливались нейровазальные и межнейральные кооперации, синаптический аппарат, снижалось количество GFAP<sup>+</sup> клеток, клеток «теней», увеличивалась численность CD68<sup>+</sup> и Bcl-2<sup>+</sup> клеток. БМА способствует нейропротекции неокортекса.

**Ключевые слова:** аллогенный биоматериал, фармакупунктура, вынужденная физическая нагрузка, нейропротекция

### **MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE NERVOUS TISSUE OF THE CEREBRAL CORTEX AFTER PHARMACOCUPUNCTURE EXPOSURE TO ALLOGENEIC BIOMATERIAL UNDER CONDITIONS OF FORCED PHYSICAL ACTIVITY**

Lebedeva A.I. \*, Musina L.A., Shangina O.R., Galautdinov M.F., Gareev E.M. Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

\* Jeol02@mail.ru

The goal is to identify the morphological features of the nervous tissue of the neocortex after forced physical activity and acupuncture administration of allogeneic biomaterial (BMA). Male rats were used in the experiment. The models of physical activity were swimming with a load and running on an inclined treadmill. After 30 days of training, the rats were injected subcutaneously into biologically active points with a BMA suspension. After 5 and 21 days, they were taken out of the experiment and the precentral gyrus of the brain was excised for histological studies. After the administration of BMA, neurovascular cooperation and the synaptic apparatus were restored, the number of GFAP<sup>+</sup> cells and «shadow» cells decreased, and the number of CD68<sup>+</sup> and Bcl-2<sup>+</sup> cells increased. BMA promotes neuroprotection of the neocortex.

**Keywords:** allogeneic biomaterial, pharmacocupuncture, forced physical activity, neuroprotection

#### **Актуальность**

Аллогенный биоматериал (БМА) (Аллоплант®) является стимулятором регенерации. При его имплантации в очаге с деструктивно-воспалительными изменениями происходит восстановление поврежденной ткани идентичной тканевому ложу [1]. В контексте воздействия длительной интенсивной физической нагрузки представляется актуальным выявить морфологические особенности тканей головного мозга, т.к. перетренированность способствует не только экстремальному физическому, но и эмоциональному перенапряжению – неврозу [2]. Одним из методов системного воздействия на организм является фармакупунктура,

но механизм изучен недостаточно. Целью исследования явилось выявление морфологических особенностей ткани неокортекса после вынужденной физической нагрузки и акупунктурного введения БМА.

### Материалы и методы

В эксперименте использовались половозрелые крысы - самцы линии Wistar массой 200–250 г. Моделью анаэробной физической нагрузки явилось принудительное плавание крыс ( $n = 40$ ) с грузом 10% от массы тела на протяжении тридцати дней подряд до полного утомления и утопления в течение 10 сек. Для оценки аэробной физической нагрузки выполнялся бег на тротуаре Exer-3/6 Open Treadmill «Columbus Instruments» при угле наклона ленты беговой дорожки  $20^\circ$  и ее скорости 27 м/мин ( $n = 40$ ). Стимулом для бега являлась реакция избегания удара электрическим током при остановке животного. После проведения плавательного теста и бега в опытных группах вводили суспензию БМА акупунктурно в биологически активные точки: 13, 15, 16, 19, 22, в контрольной вводили физ. раствор (рис. 1).

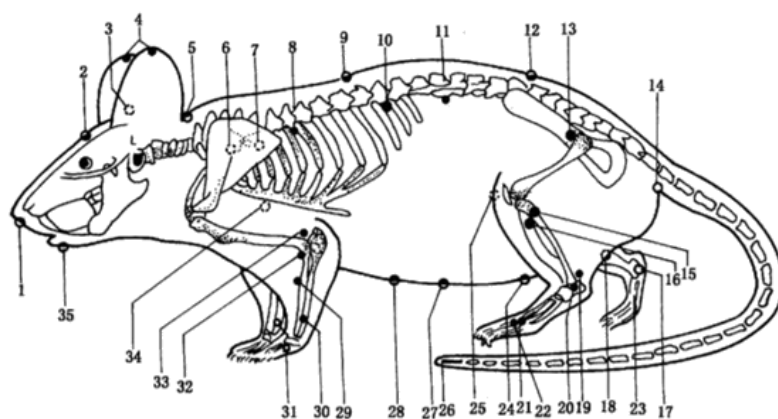


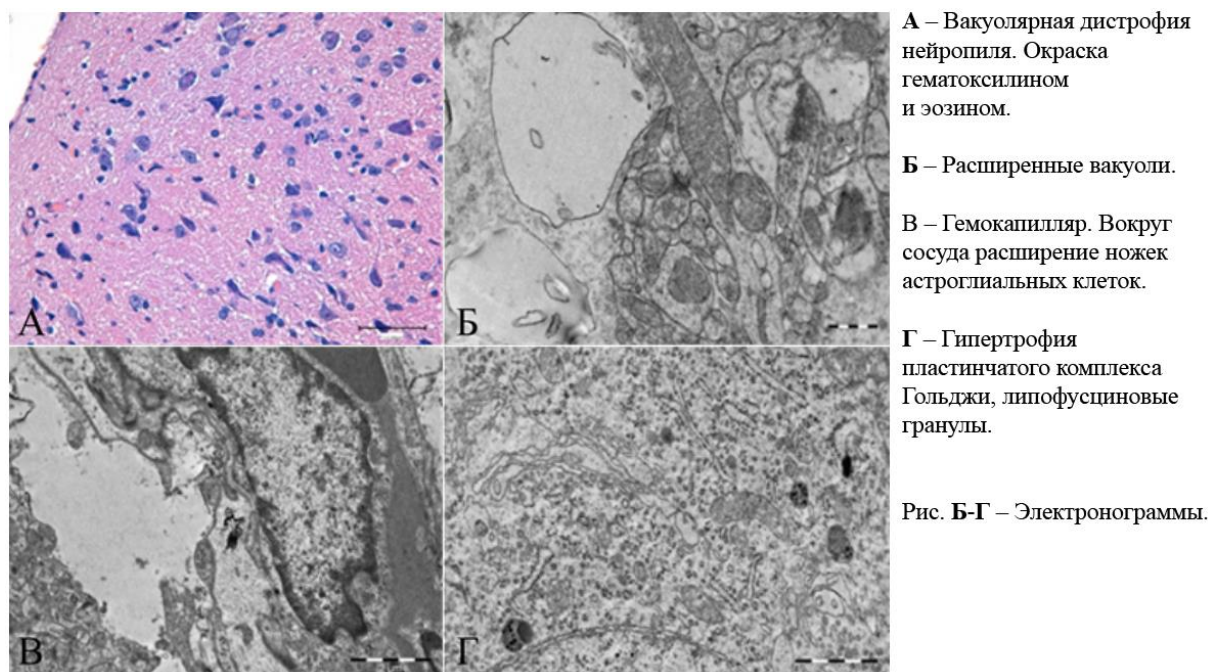
Рис. 1. Биологически активные точки

Получали 0,2% суспензию БМА, растворенную в физиологическом растворе и вводили по 0,2 мл подкожно. Общий объем суспензии составил 3,2 мл на одну особь. Для проведения морфологического исследования из опыта животных выводили путем инсультной дозы паров фторотана. Иссечение нервной ткани предцентральной извилины головного мозга проводили через 5 и 21 сутки. Кусочки ткани фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия). Проводили гистологические, иммуногистохимические (CD 68, Gfap, Vcl-2) и электронномикроскопические исследования. Для электронномикроскопического исследования ткани фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида на какодилатном буфере (pH 7,2-7,4) с дофиксацией в 1%-ном растворе  $OsO_4$ , обезвоживали в спиртах и заливали в эпон-812. Использовали ультратом EM UC 7 (Leica, Германия),

трансмиссионный микроскоп JEM-1011 (Jeol, Япония). Для подсчета клеток использовали ранговый дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллесу и критерий Манна-Уитни [3]. Использовали статистический пакет программ Statistica 10,0.

### Результаты и обсуждение

В ранние сроки (5 дней) после эксцентрической нагрузки в нервной ткани головного мозга отмечались деструктивные явления. Нейроциты были со сморщенными, пикнотичными ядрами, распределение клеток по слоям не прослеживалось, выявлялись признаки цитохроматолиза – «клеток-теней» (рис. 2а). В нейропиле выявлялись признаки отека клеток и мембранных структур, накопление разнокалиберных вакуолей, набухание митохондрий. Численность синапсов снижена (рис. 2б). Возле кровеносных сосудов наблюдалось расширение околосоудистых пространств за счет резкого отека ножек клеток астроглии (рис. 2в). В цитоплазме «светлых» нейронов определялись многочисленные липофусциновые гранулы – белок «старения». Выявлялась вакуолизация мембранных органелл: резкое расширение и удлинение цистерн комплекса Гольджи, появление вакуолей, расширение каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), разрежение цитозоля за счет редукции рибосом (рис. 2г). Через 21 день признаки деструкции нервной ткани нарастали. Обнаруживались перинуклеарные и периваскулярные отеки, накопление гиперхромных нейронов, «клеток – теней», редукция синаптического аппарата.



*Рис. 2.* Нервная ткань коры головного мозга больших полушарий в контрольной группе через 5 дней после эксцентрической нагрузки

После плавательного теста с утяжелением в ранних сроках обнаруживались подобные морфологические признаки: дезорганизация архитектоники нервных клеток коры головного мозга, пикноз ядер,

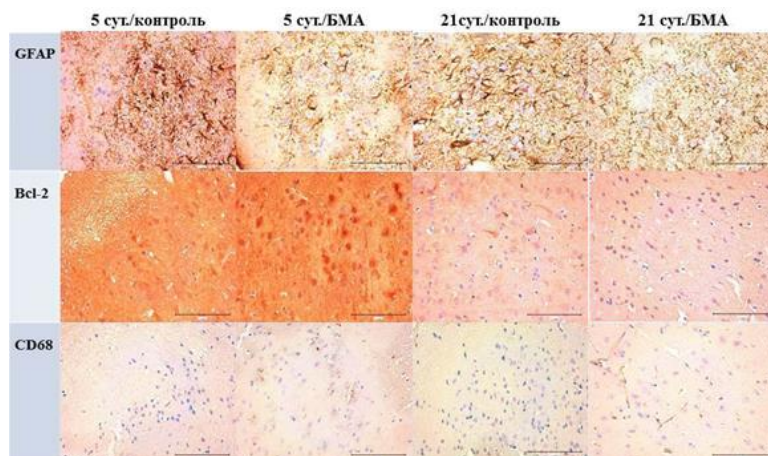


сморщивание нейроцитов, отек клеток и периваскулярного бассейна, реактивный глиоз, цитохроматоз. Нейропиль просветлен, профили миелинизированных нервных волокон разволокнены. Спустя 21 сутки в гемокapиллярах обнаруживались признаки стаза эритроцитов. Отмечались микроглиально-нейроцитарные контакты, снижение количества синапсов, увеличение гиперхромных нейроцитов, накопление липофусциновых гранул в цитоплазме. Данные признаки указывают на протекание адаптивно-компенсаторных реакций с тенденцией к необратимой деструкции нервной ткани коры головного мозга.

После эксцентрической нагрузки и фармакупунктуры с БМА через 5 суток сохранялось просветление нейропиля, присутствовали «клетки – тени». В «темных», гиперхромных нейронах обнаруживались признаки гипертрофии комплекса Гольджи – они были умеренно расширены и удлинены. Определялись признаки разволокнения миелиновых оболочек. Митохондрии нейроцитов были умеренно расширены, с просветленным матриксом, кристы сохранены. Возле гемокapилляров обнаруживались отечные ножки астроцитов. В цитоплазме «светлых» гипохромных нейронов выявлялись липофусциновые гранулы в умеренном количестве, ультраструктура внутриклеточных органелл была в целом сохранена. Деструктивные изменения были обратимые. Спустя 21 сутки в нервной ткани коры головного мозга отмечалось отсутствие «клеток – теней», плотный нейропиль. Преобладали нейрон-нейронные, контакты, нейроцито – макроглиальные кластеры. Отсутствовали признаки внутриклеточного и межклеточного отека. Количество и протяженность синапсов были увеличены. Митохондрии нервных клеток были плотными с гомогенным матриксом и параллельно ориентированными кристами. Патологических включений не выявлено. Миелиновые оболочки осмиофильные, без признаков разволокнения. Отсутствовал периваскулярный отек. Часто встречались нейровазальные контакты. В цитоплазме нейронов обнаруживались спиралеподобные тельца (производные комплекса Гольджи), связанные с увеличением функциональной активации клетки. Определялись многочисленные свободные рибосомы, полисомы, умеренно расширенная, развитая сеть ГЭР.

После вынужденного плавания и фармакупунктуры с БМА через 5 суток в коре головного мозга прослеживались все 6 слоев нейроцитов. Нейропиль был плотной консистенции, гемокapилляры без особенностей, признаков сладжирования не выявлено. Сохранялся периваскулярный отек. Миелинизированные оболочки профилей нервных клеток были плотные, осмиофильные. Выявлялись нормохромные нейроциты, имеющие типичную структуру с признаками функциональной активации: разнокалиберные митохондрии с плотным матриксом, гипертрофия комплекса Гольджи, развит везикулярный аппарат и каналы ГЭР. Цитозоль заполнен полирибосомами, встречались липофусциновые гранулы. В нейропиле обнаруживалось большое количество аксо-аксонных и аксо-дендритных синапсов с большим количеством синаптических пузырьков.

Спустя 21 сутки в гемокapиллярах головного мозга периваскулярное пространство было без особенностей. Структура макроглиальных клеток была с признаками морфо-функциональной активации. На 21-й день в опытной группе численность GFAP-клеток, оказался ниже, чем в контрольной группе  $Z = 4.52$  ( $p << 0.0001$ ). В опытной группе на 5-й и 21-й дни наблюдения численность Vcl-2<sup>+</sup> клеток оказалась выше, чем в контрольной подгруппе ( $Z = 3.5 \div Z = 4.25$ ,  $p < 0.0005 \div p << 0.0001$ ). На 5-й и 21-й дни в опытной группе численность CD-68<sup>+</sup> клеток оказалась выше ( $p < 0.004$  и менее), чем в контрольной группе, ( $Z = 5$ ,  $p << 0.0001$ ). Численность клеток-теней в опытной и контрольной группах на 5-й день значимо не различались ( $Z = 0.6$ ,  $p > 0.54$ ), а со временем в опытной группе снизилась ( $Z = 5.4$  ( $p < 0.0001$ )) по сравнению с контрольной ( $Z = 5.56 \div Z = 5.68$ ,  $p < 0.0001$ ). Количество синапсов в опытной группе было достоверно выше, чем в контрольной ( $Z = 5.51 \div Z = 5.73$ ,  $p < 0.001$ ) (рис. 3).



*Рис. 3.* Иммуногистохимическое выявление GFAP, Vcl-2 и CD 68 антител после теста «вынужденное плавание». Непрямой иммунопероксидазный метод выявления GFAP, Vcl-2 и CD 68 с докраской гематоксилином

### **Заключение**

После аэробной и анаэробной нагрузок в неокортексе крыс определялись признаки гидропической дистрофии, нейродегенерации, нарушение микроциркуляции.

После применения БМА в нейронах выявлялись признаки, свидетельствующие об активации биосинтетической деятельности нейроцитов, в неокортексе снижение количества GFAP<sup>+</sup> клеток, клеток «теней», увеличение CD68<sup>+</sup> и Vcl-2<sup>+</sup> клеток. Происходило предупреждение глиоза. Нормализация микроциркуляции, восстановление нейровазальных и межнейральных коопераций, восстановление синаптического аппарата служит свидетельством компенсаторно-приспособительных реакций, направленных на восстановление морфофункциональных характеристик головного мозга и стимуляцию нейропротекторного и нейрореставрационного механизма.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



### Список литературы

1. Мулдашев Э.Р., Муслимов С.А., Галимова В.У. и др. Биологические основы применения биоматериалов Аллоплант в регенеративной хирургии // в кн. Alloplant® Регенеративная медицина. Под ред. Э.Р. Мулдашева. Уфа: ГУП «Государственное республиканское издательство «Башкортостан». 2014, С. 30–42.
2. Гордон Н.Ф. Хроническое утомление и двигательная активность. К.: Олимпийская литература. 1999: 126 с.
3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера. 2002: 312 с.

© Лебедева А.И., Мусина Л.А., Шангина О.Р.,  
Галаутдинов М.Ф., Гареев Е.М., 2024

УДК 577.29

### ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ДОФАМИНА, СЕРОТОНИНА И ЛЕПТИНА В ПОМК-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНАХ ЯДРА ОДИНОЧНОГО ТРАКТА

Михрина А.Л.<sup>1\*</sup>, Романова И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The Hebrew University Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

<sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

\* nastya\_mihrina@mail.ru

Нейроны ядра одиночного тракта – одна из крупных популяций мозга, в которой вырабатывается проопиомеланокортин (ПОМК) – предшественник меланокортиновых пептидов. Эти нейроны, как и ПОМК-нейроны аркуатного ядра гипоталамуса, вовлечены в регуляцию пищевого поведения. С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения и конфокальной микроскопии в ПОМК-иммунопозитивных нейронах различных отделов ядра солитарного тракта было показано присутствие рецепторов дофамина (D1 и D2), серотонина (5HT1В подтипа), лептина. Полученные результаты свидетельствуют об участии дофамина, серотонина и лептина в регуляции функциональной активности ПОМК-нейронов ядра солитарного тракта, как и ПОМК-нейронов аркуатного ядра гипоталамуса, что свидетельствует об общих механизмах регуляции ПОМК-нейронов различных отделов мозга.

**Ключевые слова:** проопиомеланокортин, ядро солитарного тракта, дофамин, серотонин, лептин, аркуатное ядро гипоталамуса

# THE EXPRESSION OF DOPAMINE, SEROTONIN AND LEPTIN RECEPTORS IN POMC-IMMUNOPOSITIVE NEURONS OF THE NUCLEUS SOLITARY TRACT

Mikhina A.L.<sup>1\*</sup>, Romanova I.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The Hebrew University Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

<sup>2</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

\* nastya\_mihrina@mail.ru

Neurons of the nucleus of the solitary tract are one of the large populations of the brain that produce proopiomelanocortin (POMC) - is a precursor of melanocortin peptides. These neurons, like POMC-neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus, are involved in the regulation of feeding behavior. Using double fluorescent immunolabeling and confocal microscopy, the presence of dopamine (D1 and D2), serotonin (5HT1B subtype), and leptin receptors was shown in POMC-immunopositive neurons of various parts of the nucleus of the solitary tract. The results indicate the involvement of dopamine, serotonin, and leptin in the regulation of the functional activity of POMC-neurons of the nucleus of the solitary tract, as well as POMC-neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus, which indicates common mechanisms of regulation of POMC-neurons of various parts of the brain.

**Keywords:** proopiomelanocortin, nucleus of the solitary tract, dopamine, serotonin, leptin, arcuate nucleus of the hypothalamus

## Актуальность

Проопиомеланокортин (ПОМК) – молекула-предшественник, из которого образуются меланокортиновые (АКТГ,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -МСГ), а также и опиоидные пептиды [1]. Экспрессия гена, кодирующего ПОМК, у млекопитающих выявлена в различных тканях организма. В головном мозге крупные популяции ПОМК-продуцирующих нейронов выявлены в аркуатном ядре гипоталамуса (АРК) и в ядре одиночного тракта (NTS – nucleus tractus solitaries) [2]. Показано, что эти нейроны вовлечены в регуляцию пищевого поведения и энергетического баланса организма. ПОМК-нейроны АРК является фактором, тормозящим аппетит [3]. В этих нейронах выявлена экспрессия различных рецепторов, которые воспринимают сигналы как из периферической крови, так и от нейронов ЦНС. При нарушении пищевого поведения, в частности при ожирении, в ПОМК-нейронах АРК отмечается изменения уровня рецепторов дофамина (D1- и D2-подтипов), рецепторов серотонина 5HT1B и 5HT2C подтипов, рецепторов лептина, что свидетельствует об изменении дофаминовой, серотониновой, а также и лептиновой сигнализации в ПОМК-нейронах при ожирении [4]. В различных исследованиях показаны проекции между ПОМК-продуцирующими нейронами АРК и NTS [5], что свидетельствует об интегративных взаимодействиях между этими структурами что, вероятно, может иметь важное значение для

компенсаторных механизмов при патологиях. Однако механизмы регуляции ПОМК-продуцирующих нейронов NTS мало изучены. В частности, в ПОМК-нейронах NTS выявлены рецепторы к серотонину 5HT<sub>2C</sub> подтипа [6], экспрессия которых менялась при ожирении. Цель настоящего исследования – оценить возможность экспрессии рецепторов дофамина (D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub>), серотонина 5HT<sub>1B</sub> и лептина в ПОМК-нейронах NTS.

### **Материалы и методы**

Эксперименты проведены на 5 половозрелых самцах мыши линии C57Bl/6J (масса 22–24 г). После наркоза хлоралгидратом (400 мг/кг) была проведена транскардиальная перфузия мозга: сначала 20 мл 0.1 М натрий-фосфатным буфером (PBS, pH 7.4), затем 50 мл 4%-ным раствором параформальдегида, растворенного в 0.2 М PBS. Мозг дофиксировали в течение 4 ч (4°C) в том же фиксаторе, промывали в холодном PBS и после криопротекции (4°C) в 30%-ном растворе сахарозы, разведенной в 0.02 М PBS, замораживали в изопентане при –42°C и хранили при –80°C. С помощью криостата (CM-1510, Leica Microsystems, Германия) из области продолговатого мозга изготавливали чередующиеся серии фронтальных срезов (16 мкм) согласно атласу мозга мыши, каждый седьмой срез монтировали на одно стекло Superfrost/plus (Menzel, Германия), высушивали при комнатной температуре и хранили при –20°C. На одном стекле монтировали срезы от 2–3 мышей. Срезы на первом стекле окрашивали толуидиновым синим для контроля области локализации NTS. Двойное флуоресцентное иммуномечение проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [4]. После демаскировки антигена кипячением в натрий-цитратном буфере (pH 6.0) срезы промывали в PBS, а затем блокировали сначала в растворе 100 mM глицина 40 мин, а затем 1 ч в смеси сывороток (3% – козы, 2% быка и 3% цыпленка), растворенных в PBS с 0.01% Triton X-100 (PBST). Затем срезы инкубировали в течение 48 ч (4°C) с первичными антителами, которые разводили в 2% блокирующем растворе. Для реакций использовали смесь первичных антител мыши против ПОМК (Abcam, 1:500) с антителами кролика против D<sub>1</sub>-рецепторов дофамина (Abcam, 1:200), или кролика против D<sub>2</sub>-рецепторов дофамина (Chemicon International, 1:200), или кролика против рецепторов серотонина 5HT<sub>1B</sub> (US Biological, 1:100), или кролика против рецепторов лептина (LepR, Novus Biologicals, 1:100).

После тщательной промывки срезы инкубировали в течение 1 ч в коктейле вторичных антител, конъюгированных с различными флуоресцентными метками – цыпленка против кролика с Alexa-488 и осла против мыши с Alexa-568 (Invitrogen) в разведении 1:1000. После промывки в PBS срезы заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol (Sigma) и хранили при 4°C до ее полимеризации. Специфичность иммуногистохимической реакции с помощью реакций без первичных антител).

Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DMi6000 и лазерной сканирующей конфокальной установки Leica TCS SP5

(Leica Microsystems, Германия). Был использован иммерсионный объектив х63, лазеры с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF.

### Результаты и обсуждение

Анализ изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии, демонстрирует присутствие в ПОМК-иммунопозитивных клетках NTS рецепторов дофамина двух подтипов (D1 и D2, Рис. 1а и б), а также рецепторов серотонина 5HT<sub>1B</sub> (Рис. 1в) и лептина (Рис. 1г).

Полученные данные согласуются с результатами исследования ПОМК-иммунопозитивных нейронов АРК [4] и демонстрируют общие механизмы регуляции различных популяций ПОМК-нейронов мозга.

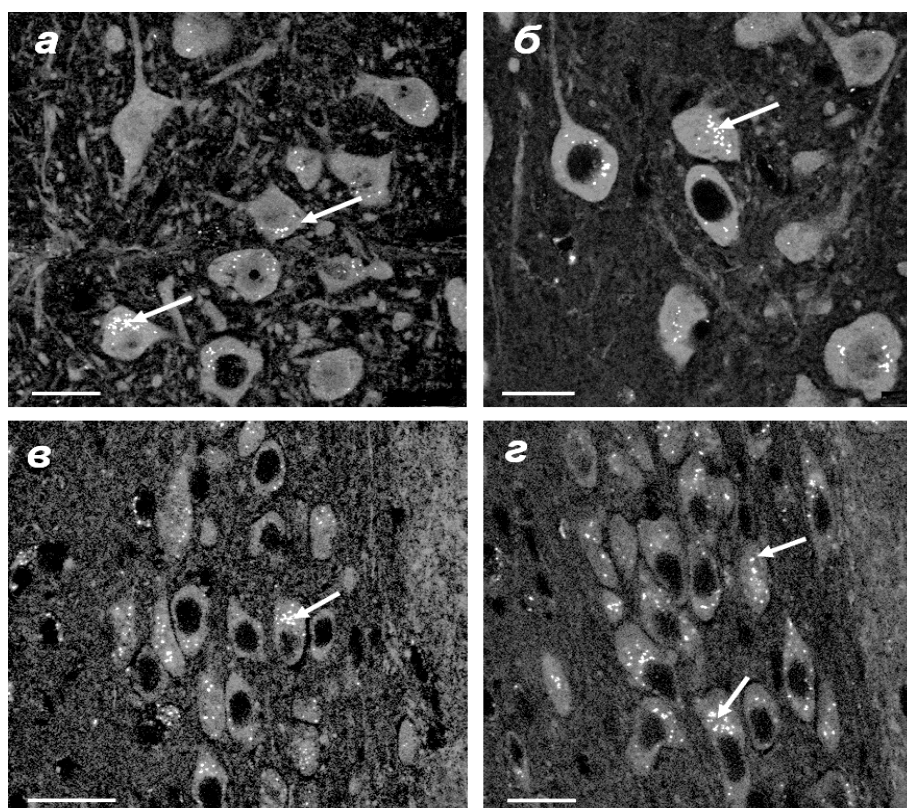


Рис. 1. Черно-белое изображение двойного флуоресцентного иммуномечения D1- (а) и D2-рецепторов дофамина (б), 5HT<sub>1B</sub> рецепторов серотонина (в) и рецепторов лептина (г) в ПОМК-нейронах ядра одиночного тракта мыши C57BL/6J. Стрелки указывают на рецепторы (светлые точки), локализованные в телах ПОМК-нейронов.

Масштаб 20 мкм

Работа поддержана госзаданием № 075-00264-24-00.

Все эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 2/5-2023), European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Cone R.D. Studies on the physiological functions of the melanocortin system // *Endocr. Rev.* 2006. Vol. 27. Pp. 736–749.
2. Rodrigues A.R., Almeida H., Gouveia A.M. Intracellular signaling mechanisms of the melanocortin receptors: current state of the art // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 2. No 7. Pp. 1331–45.
3. Schwartz M.W., Morton G.J. Obesity: keeping hunger at bay // *Nature.* 2002. Vol. 418. Pp. 595–597.
4. Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O. The Leptin, Dopamine and Serotonin Receptors in Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents // *Neurochem Res.* 2018. Vol. 43. No 4. Pp. 821–837.
5. Wang D., He X., Zhao Z., Feng Q., Lin R., Sun Y., Ding T., Xu F., Luo M., Zhan C. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons // *Front Neuroanat.* 2015. Vol. 9. Article 40.
6. D'Agostino G., Lyons D., Cristiano C., Lettieri M., Olarte-Sanchez C., Burke L.K., Greenwald-Yarnell M., Cansell C., Doslikova B., Georgescu T., Martinez de Morentin P.B., Myers M.G. Jr, Rochford J.J., Heisler L.K. Nucleus of the Solitary Tract Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptors Modulate Food Intake // *Cell Metab.* 2018. Vol. 28. No 4. Pp. 619-630.e5.

© Михрина А.Л., Романова И.В., 2024

УДК 612.825.2: 612.825.4

### **ИЗМЕНЕНИЯ АЛЬФА-РИТМА И ВАРИАБЕЛЬНОСТИ КАРДИОРИТМА У ПРАВШЕЙ, ЛЕВШЕЙ И АМБИДЕКСТРОВ ПРИ МЫСЛЕННОМ ВЫПОЛНЕНИИ ДВИЖЕНИЙ**

Моренова К.А.\* , Ведясова О.А.

Самарский национальный исследовательский университет  
им. академика С.П. Королева, г. Самара, Россия

\* morenova\_ks@mail.ru

Работа выполнена в аспекте изучения физиологических механизмов двигательной активности у лиц с разными типами полушарного доминирования. В испытании участвовали 122 человека, у которых анализировали спектральную мощность альфа-ритма ЭЭГ и параметры кардиоритма при воображении движений правой и левой ног. У правшей в этих условиях выявлена десинхронизация альфа-ритма по всей коре, а у амбидекстров – в теменных областях. У левшей достоверной динамики альфа-ритма не обнаружено. При этом корреляционные связи изменений альфа-волн и сердечного ритма оказались у правшей и левшей более выраженными, чем у амбидекстров.

**Ключевые слова:** альфа-ритм, вариабельность сердечного ритма, профиль моторного доминирования, мысленные движения ног

## **CHANGES IN ALPHA RHYTHM AND HEART RATE VARIABILITY IN RIGHT-HANDED, LEFT-HANDED AND AMBIDEXTERS DURING MENTAL PERFORMANCE OF MOVEMENTS**

Ivanov I.I.1\*, Petrov P.P.1,2

Morenova K.A.\* , Vedyasova O.A.

Samara National Research University, Samara, Russia

\* morenova\_ks@mail.ru

The work was carried out in the aspect of studying the physiological mechanisms of motor activity in individuals with different types of hemispheric dominance. The test involved 122 people, who analyzed the spectral power of the EEG alpha rhythm and heart rate parameters while imagining the movements of the right and left legs. In right-handers under these conditions, desynchronization of the alpha rhythm was detected throughout the entire cortex, and in ambidexters – in the parietal and occipital regions. In left-handers, no significant dynamics of the alpha rhythm were found. At the same time, the correlation between changes in alpha waves and heart rate turned out to be more pronounced in right-handers and left-handers than in ambidextrous people.

**Keywords:** alpha-rhythm, heart rate variability, motor dominance profile, mental leg movements

### **Актуальность**

Паттерны ЭЭГ, характерные для воображаемых движений в настоящее время изучаются как прикладными, так и фундаментальными направлениями нейробиологии [1]. Во многих работах показано, что личностные характеристики испытуемых являются значимыми факторами, детерминирующими динамику ритмов ЭЭГ [2], а кроме того, влияют на взаимосвязь вариабельности сердечного ритма (ВСР) с высокочастотной альфа-активностью [3]. Среди таких факторов важное место занимает межполушарная функциональная асимметрия, в том числе такое ее проявление как моторное доминирование. Зависимость паттерна ЭЭГ и характера его корреляций с деятельностью сердца от профиля моторного доминирования изучена в недостаточной степени [4]. Также, весьма малочисленными являются сведения об сопряженных изменениях ЭЭГ и ВСР у человека при воображаемой двигательной деятельности, в частности, при мысленных движениях ног. Исследования в этом направлении актуальны в плане понимания физиологических и ментальных процессов, сопровождающих регуляцию произвольных движений.

Цель работы: оценка изменений спектральной мощности (СМ) волн ЭЭГ альфа-диапазона и параметров ВСР во время воображения сложного движения правой и левой ног у лиц с разными индивидуальными профилями моторного доминирования.

## Материалы и методы

В исследовании участвовали испытуемые правши (60), левши (32) и амбидекстры (30) в возрасте 18–23 лет. ЭЭГ регистрировали на нейровизоре NVX 36 digital DC EEG по системе «10–20» в состоянии покоя (1 мин) и при мысленных движениях (одновременное сгибание и разгибание в коленном и голеностопном суставах) правой, а затем левой ноги (5 с каждое движение). Анализировали СМ (мкВ<sup>2</sup>) ЭЭГ в альфа-диапазоне (8–13 Гц) в симметричных лобных (Fp1–Fp2, F3–F4), центральных (C3–C4), теменных (P3–P4) и затылочных (O1–O2) отведениях.

Для записи ВСП применяли приборно-программное обеспечение «ЭЛОКС-01С2». Ритмограммы записывали в покое и при мысленных двигательных актах в течение 5 мин. Оценивали статистические, диагностические и спектральные показатели ВСП.

Статистическую обработку результатов проводили в программе SigmaPlot 12.5. Достоверность изменений ЭЭГ и ВСП, межполушарные и межгрупповые различия оценивали при помощи тестов ANOVA. При достоверных изменениях выполняли апостериорные сравнения (method Dunnett's). Взаимосвязь между параметрами ВСП и СМ альфа-ритма ЭЭГ определяли по коэффициентам корреляции (r) Спирмена. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего (M±SEM). Статистически значимыми считали различия при p < 0,05.

## Результаты и обсуждение

Обнаружено, что СМ альфа-ритма по-разному менялась при выполнении мысленных движений у лиц с разными профилями моторной асимметрии (табл.1).

Таблица 1.

Спектральная мощность альфа-ритма (мкВ<sup>2</sup>) в лобных, центральных, теменных и затылочных отведениях при мысленных движениях ног

		Правши	Левши	Амбидекстры
Fp1	Покой	12,748 ± 1,482	11,039 ± 1,000	9,415 ± 1,148
	ВП	5,606 ± 0,350 ***	10,889 ± 2,652	6,422 ± 0,727
	ВЛ	6,292 ± 0,564 ***	8,460 ± 0,952	6,066 ± 0,650
Fp2	Покой	13,280 ± 1,565	10,976 ± 0,964	11,378 ± 2,403
	ВП	6,632 ± 0,844 ***	11,309 ± 2,925	8,050 ± 1,665
	ВЛ	8,610 ± 2,142 *	8,113 ± 0,832	9,998 ± 4,217
C3	Покой	15,342 ± 1,896	14,742 ± 1,692	11,236 ± 1,821
	ВП	8,789 ± 1,520 **	13,077 ± 2,627	7,206 ± 0,83
	ВЛ	8,190 ± 0,997 **	11,045 ± 1,537	7,736 ± 1,045
C4	Покой	14,091 ± 1,336	13,775 ± 1,232	10,490 ± 1,433
	ВП	6,921 ± 0,534 ***	14,638 ± 4,421	7,572 ± 1,170
	ВЛ	7,402 ± 0,719 ***	11,27 ± 1,792	6,697 ± 0,868
P3	Покой	21,572 ± 2,434	19,988 ± 2,305	14,705 ± 2,346
	ВП	10,772 ± 1,031 ***	15,904 ± 2,877	9,402 ± 1,094 *
	ВЛ	11,455 ± 1,257 ***	13,838 ± 2,293	10,004 ± 1,281 *
P4	Покой	18,979 ± 2,107	16,974 ± 1,918	13,719 ± 1,829
	ВП	9,734 ± 1,036 ***	17,244 ± 4,729	9,401 ± 1,229 *

	ВЛ	10,445 ± 1,384 ***	14,465 ± 3,329	9,866 ± 1,216
O <sub>1</sub>	Покой	16,670 ± 2,081	17,903 ± 2,207	13,978 ± 2,628
	ВП	9,794 ± 1,318 **	15,373 ± 3,082	9,553 ± 1,451
	ВЛ	10,341 ± 1,597 **	12,789 ± 1,488	10,071 ± 1,687
O <sub>2</sub>	Покой	19,872 ± 3,313	20,354 ± 2,786	28,325 ± 14,229
	ВП	10,420 ± 1,374 **	18,202 ± 4,183	10,416 ± 1,411
	ВЛ	11,017 ± 1,605 **	15,464 ± 1,986	10,961 ± 1,493

Примечание. ВП и ВЛ – воображаемые движения правой и левой ног; \*(p<0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001) – достоверность изменений относительно покоя.

Значимое снижение СМ альфа-волн отмечалось у правшей при движениях как правой, так и левой ногой во всех исследуемых отведениях, за исключением F<sub>3</sub>. У левшей достоверных изменений относительно состояния покоя не выявлено, тогда как у амбидекстров снижение СМ альфа-ритма наблюдалось только в теменных отведениях, причем чаще при мысленном действии правой ногой.

Анализ ритмограмм не показал значимых изменений параметров ВСР во время мысленных действий по сравнению с покоем. Вместе с тем были выявлены корреляционные связи между показателями ВСР и СМ альфа-ритма ЭЭГ у правшей и левшей (табл. 2).

Таблица 2.

Коэффициенты корреляции (r) параметров ВСР и СМ альфа-ритма у правшей и левшей в покое и при мысленных двигательных задачах

		Fp <sub>1</sub>	Fp <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>
Правши	Покой								
	PNN50			0,721					
	PAR			0,719					
	SI			-0,762					
	Мысленное движение правой ногой								
	VLF							0,75	
	PAR	0,683	0,683	0,695					
	SI			-0,714					
	Мысленное движение левой ногой								
	HRV							0,786	0,786
	TINN							0,786	0,786
	Amo							-0,746	-0,746
	VLF			0,714		0,75	0,714	0,857	0,857
	Total			0,821		0,786	0,821	0,857	0,857
	SIM							-0,726	-0,726
PAR							0,786	0,786	
SI							-0,690	-0,690	
Левши	Покой								
	HR			-0,867		-0,875			
	LF						0,906		
	NN			<b>0,961</b>		<b>0,985</b>			
Мысленное движение правой ногой									



Dx			0,922					
Мысленное движение левой ногой								
SDNN	<b>0,951</b>							
HRV				<b>0,966</b>	<b>0,985</b>	<b>0,985</b>		
TINN				<b>0,989</b>	<b>0,945</b>	<b>0,964</b>		
Amo				<b>-0,936</b>	-0,907	<b>-0,940</b>		

*Примечание.* Полужирным шрифтом выделены коэффициенты корреляции при  $p < 0,01$ ; все остальные связи достоверны при  $p < 0,05$ .

У правой руки наибольшее количество взаимосвязей обнаружено при мысленном движении в суставах левой ноги, причем более тесно параметры ВСР коррелировали со СМ затылочного альфа-ритма ( $O_1$ ,  $O_2$ ). У левой руки корреляции были более сильными, чем у правой, и преобладали при мысленных сгибаниях левой ноги в отведениях  $F_4$ ,  $C_3$  и  $C_4$ . У амбидекстров отмечалась корреляция СМ альфа-волн в отведении  $F_3$  с динамикой коэффициента PAR ( $r = 0,886$ ,  $p < 0,05$ ), причем только в одном случае – при мысленном движении левой ноги.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Kline A. EEG differentiates left and right imagined Lower Limb movement // *Gait & Posture*. 2021. Vol. 84. Pp. 148–154.
2. Джебраилова Т.Д., Коробейникова И.И., Каратыгин Н.А., Бирюкова Е.В., Венерина Я.А. Динамика спектральных характеристик ЭЭГ у лиц с разной личностной тревожностью при когнитивной деятельности // *Физиология человека*. 2021. Т. 47. № 1. С. 20–30.
3. Афтанас Л.И., Брак И.В., Рева Н.В., Павлов С.В. Осцилляторные системы мозга и индивидуальная вариабельность оборонительного рефлекса сердца у человека // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2013. Т. 99. № 11. С. 1342–1356.
4. Guttman-Flury E., Sheng X., Zhu X. Channel selection from source localization: A review of four EEG-based brain–computer interfaces paradigms // *Behavior Research Methods*. 2023. Vol. 55. Pp. 1980–2003.

© Моренова К.А., Ведясова О.А., 2024

## ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СЛЕДОВЫМИ АМИНАМИ

Муртазина Р.З.<sup>1\*</sup>, Гайнетдинов Р.Р.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, Россия

<sup>2</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

\* ramilya.murtazina@gmail.com

Известно, что рецепторы TAAR плохо экспрессируются на мембране в гетерологичных системах *in vitro*. Это, по-видимому, связано с тем, что белки остаются в эндоплазматическом ретикулуме и впоследствии деградируют в протеасоме. Для повышения уровня мембранной экспрессии были протестированы различные N-концевые таги других GPCR (родопсиновый, бета2-адренергический, глутаматный). Кроме того, мы оценили котрансфекцию шаперонов (RTP1S, RTP2) и Golf, Ric8b, обычно используемую при деорфанизации обонятельных рецепторов. В результате мы обнаружили, что рецептор TAAR9 активен без тагов и шаперонов. TAAR5 функционирует только при экспрессии с N-концевым родопсиновым тагом. С другой стороны, для работы TAAR6 была необходима котрансфекция с шаперонами. Используя этот подход, мы идентифицировали два новых лиганда TAAR6.

**Ключевые слова:** рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами; TAAR; GPCR; NanoBiT

## HETEROLOGOUS EXPRESSION OF TRACE AMINE-ASSOCIATED RECEPTORS

Murtazina R.Z.<sup>1\*</sup>, Gainetdinov R.R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

\* ramilya.murtazina@gmail.com

TAAR receptors are known to be poorly expressed on the membrane in heterologous systems *in vitro*. This is probably due to the fact that the proteins remain in the endoplasmic reticulum and are subsequently degraded in the proteasome. In this work, we tested various N-terminal tags of GPCRs (rhodopsin, beta2-adrenergic, glutamate) in order to increase the plasmatic expression level. Also, we evaluated cotransfection of chaperones (RTP1S, RTP2) and Golf, Ric8b, commonly used in deorphanization of olfactory receptors. As a result, we found that the TAAR9 receptor is active without tags and chaperones. TAAR5 induced signaling only when expressed with an N-terminal rhodopsin tag. On the other hand, cotransfection of chaperones was required for the function of TAAR6. Using this approach, we identified two new TAAR6 ligands.

**Keywords:** trace amine-associated receptors, TAAR, GPCR, NanoBiT

## Актуальность

Открытие в 2001 году нового класса рецепторов GPCR – рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами (trace amine-associated receptors, TAAR, 6 функциональных рецепторов идентифицированы у человека, TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8 и TAAR9) расширило возможности изучения функциональной роли эндогенных следовых аминов в физиологии и патологии млекопитающих [1,2]. Следовые амины (СА), такие, как  $\beta$ -фенилэтиламин, тирамин, триптамин и октопамин, структурно близки к классическим моноаминам и играют важную роль в физиологии беспозвоночных, но их функции в организме млекопитающих, где они представлены в «следовых» количествах, остаются малоизученными. В целом, СА присутствуют в ЦНС и по-видимому функционируют параллельно с моноаминергическими путями, а также структурно связаны, колокализуются и высвобождаются вместе с биогенными аминами. Наиболее изученным рецептором среди TAAR является TAAR1. Результаты исследований с использованием селективных лигандов TAAR1 и генетически модифицированных животных с выключенным TAAR1, в исследованиях позволили предположить, что TAAR1 может быть перспективной терапевтической мишенью при разработке новых фармакотерапевтических препаратов для лечения таких нейropsychических расстройств, как шизофрения, депрессия, СДВГ, наркомании, болезни Паркинсона, нарушения сна [3]. Остальные TAAR сначала были описаны как новый вид обонятельных рецепторов со схожим паттерном экспрессии в обонятельном эпителии и функцией детекции летучих аминов [4]. Однако, на данный момент существуют исследования об их экспрессии и функционировании как в ЦНС, так и на периферии. Например, второй по изученности рецептор, TAAR5, экспрессируется в миндалевидном теле и гипоталамусе [5]. Одним из важных подходов исследования TAAR в отсутствие селективных лигандов стала модель трансгенных животных с нокаутом генов. На данный момент описаны мыши с нокаутом генов TAAR2 и TAAR5. Было показано, что выключение TAAR2 влияет на дофаминергическую систему мозга, а TAAR5, по-видимому, играет функциональную роль не только в обонянии, но также может быть вовлечен в контроль аффективного поведения [6–8]. Предполагается, что препараты-антагонисты TAAR5 могут обладать антидепрессивным и противотревожным действием, поэтому он представляет интерес как новая мишень для разработки психотропных препаратов [6]. Что касается остальных TAAR (TAAR6, TAAR8, TAAR9), в настоящее время опубликованных данных о функции этих рецепторов за пределами обонятельной системы, практически нет. Сигнальные пути активации TAAR представляют собой особенный интерес, но многие группы столкнулись с проблемой изучения TAAR *in vitro* из-за сложностей с их экспрессией на клеточной мембране, по крайней мере, в гетерологических клеточных системах [9]. Одной из причин сложности мембранной

экспрессии может быть отсутствие гликозилирования на N-конце, которое было показано для TAAR1 [10].

Исходя из приведенной выше информации, разработка системы для гетерологической экспрессии рецепторов TAAR и поиск лигандов представляет собой актуальную задачу современной биологии.

### **Материалы и методы**

Для экспрессии генов TAAR в клетках HEK293T или CHO-K1 под контролем промотора CMV были получены плазмиды на основе pcDNA3.1 или pcDNA3.0. В целях повышения уровня мембранной экспрессии были добавлены разные N-концевые таги, состоящий из первых 9 аминокислот бета2-адренергического рецептора (MCQPGNGSA), первых 20 аминокислот родопсина человека (MNGTEGPNFYVPFSNATGVV), 24 аминокислот глутаматного рецептора (MVLLLLILSVLLLKEDVRGSAQSTR). Гены TAAR методом ПЦР амплифицировали с геномной ДНК человека, крысы или мыши с введением рестрикционных сайтов с использованием праймеров (пр-во компании «Евроген», Москва). Полученный продукт гидролизовали рестриктазами и встраивали в плазмиду, гидролизованную этими же рестриктазами. Также были сконструированы векторы, экспрессирующие шапероны обонятельных рецепторов (RTP1S, RTP2), Golf и вспомогательный белок Ric8b. Для экспрессии TAAR с SmBiT на C-конце последовательности были клонированы в вектор pIRESneo или pIRESHyg3. Векторы, экспрессирующие G-белки с LgBiT на N-конце, были любезно предоставлены проф. Ciruela (Ун-т Барселоны, Испания).

BRET и NanoBiT. Клеточную линию HEK293T или CHO-K1 трансфецировали двумя векторами для транзientной экспрессии генов (рецептора TAAR и биосенсора) при помощи липофектамина. Затем клетки переносили в 96-луночный планшет и культивировали в течение 24 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе на минимальной питательной среде MEM. Далее удаляли среду из лунок и заменяли ее буферным раствором PBS с ингибитором фосфодиэстеразы IBMX. Сразу же добавляли субстрат для люциферазы – коэлектенаразин-h для BRET, фуримазин для NanoBiT, тем самым активируя люминисценцию. По истечении 10 минут в каждую лунку добавляли раствор лиганда и проводили считывание флуоресценции при длине волны 480 нм (для донора) и 530 нм (для акцептора) для BRET или люминисценции для NanoBiT при помощи планшетного ридера Mithras LB943.

### **Результаты и обсуждение**

В данной работе мы оценивали влияние различных условий на функциональную экспрессию TAAR рецепторов *in vitro*. Для оценки активности рецепторов оценивали изменение концентрации цАМФ в клетках, в ответ на действие различных химических соединений с помощью метода BRET. Метод основан на экспрессии гибридного гена Rluc-EPAC-YFP, продукт которого является биосенсором мониторинга активации G $\alpha$ s-сигнального пути. В его основе лежит цАМФ-зависимый

фактор EPAC1 (Exchange protein activated by cAMP 1), который в ответ на связывание молекулы цАМФ изменяет свою конформацию. Данные BRET дополнили относительно новой методикой NanoBiT, основанной на разделении фермента NanoLuc на два полипептида 1.3 кДа (SmBiT) и 18 кДа (LgBiT). Таким образом, при активации рецептора к TAAR-SmBiT присоединяется G-белок-LgBiT, что приводит к возвращению активности люциферазы и люминесцентному сигналу.

В качестве N-концевых тагов были использованы различные последовательности от рецепторов с хорошей мембранной локализацией: родопсина (Rho), бета2-адренорецептора ( $\beta 2$ ), глутаматного рецептора (mGluR5) человека. Оказалось, что таг mGluR5 позволяет эффективно экспрессировать функциональный рецептор TAAR1 и TAAR9.  $\beta 2$ -таг позволял оценивать активность рецепторов TAAR1, TAAR6, TAAR9. Рецепторы TAAR2 и TAAR8 показывали очень слабый ответ на известные агонисты со всеми перечисленными тагами.

Кроме того, мы оценили котрансфекцию шаперонов (RTP1S, RTP2) и Golf, Ric8b, обычно используемую при деорфанизации обонятельных рецепторов. В результате мы обнаружили, что такие рецепторы, как TAAR9, были активны и без тагов и шаперонов. TAAR5 индуцировал сигналинг только с N-концевым тегом родопсина в присутствии шаперонов. Активацию TAAR6 также наблюдали только при котрансфекции с шаперонами. Используя этот подход, мы идентифицировали два новых лиганда TAAR6.

Работа выполнена при поддержке СПбГУ, ID: 95444211. Исследования проведены с использованием оборудования РЦ РМиКТ СПбГУ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Bunzow J.R., Sonders M.S., Arttamangkul S., Harrison L.M., Zhang G., et al. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor // *Mol. Pharmacol.* 2001. Vol. 60, № 6. P. 1181–1188.
2. Borowsky B., Adham N., Jones K.A., Raddatz R., Artymyshyn R., et al. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98, № 16. P. 8966–8971.
3. Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Berry M.D. Trace amines and their receptors // *Pharmacol. Rev.* 2018. Vol. 70, № 3. P. 549–620.
4. Liberles S.D., Buck L.B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium // *Nature.* 2006. Vol. 442, № 7103. P. 645–650.
5. Dinter J., Mühlhaus J., Wienchol C.L., Yi C.X., Nürnberg D., et al. Inverse agonistic action of 3-iodothyronamine at the human trace amine-associated receptor 5 // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 2. P. 1–19.

6. Espinoza S., Sukhanov I., Efimova E.V., Kozlova A., Antonova K.A., et al. Trace Amine-Associated Receptor 5 Provides Olfactory Input Into Limbic Brain Areas and Modulates Emotional Behaviors and Serotonin Transmission // *Front. Mol. Neurosci.* 2020. Vol. 13, № March. P. 1–10.
7. Efimova E.V., Kozlova A.A., Razenkova V., Katolikova N.V., Antonova K.A., et al. Increased dopamine transmission and adult neurogenesis in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knockout mice // *Neuropharmacology.* 2021. Vol. 182, № October 2020. P. 108373.
8. Efimova E.V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., Katolikova N.V., Shemiakova T.S., et al. Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis // *Front. Behav. Neurosci.* 2022. Vol. 16. P. 847410.
9. Berry, Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Shahid M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges // *Pharmacol. Ther.* 2017. Vol. 180. P. 161–180.
10. Barak L.S., Salahpour A., Zhang X., Masri B., Sotnikova T.D., et al. Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor // *Mol. Pharmacol.* 2008. Vol. 74, № 3. P. 585–594.

© Муртазина Р.З., Гайнетдинов Р.Р., 2024

УДК 616.8-003.99

## **ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРЫС DAT-KO**

Мусина Л.А.<sup>1\*</sup>, Хисматуллина З.Р.<sup>2</sup>, Шангина О.Р.<sup>1</sup>, Лебедева А.И.<sup>1</sup>,  
Гайнетдинов Р.Р.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

<sup>2</sup> Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

<sup>3</sup> Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Клиника высоких медицинских технологий им. Пирогова СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

\* morphoplant@mail.ru

Цель исследования – изучить ультраструктуру внутренних слоев сетчатки глаза крыс линии DAT-KO в сравнении с сетчаткой крыс линии Wistar. Материал и методы. Методом растровой электронной микроскопии исследовали сетчатку глаза половозрелых крыс линии Wistar (4 глаза) и DAT-KO (10 глаз) без дофаминового транспортера. Результаты исследования: у крыс линии DAT-KO выявлены ультраструктурные изменения внутренних слоев сетчатки в виде признаков дистрофических и деструктивных процессов, что может быть признаком развития дегенеративного заболевания сетчатки глаза на фоне нарушения

модулирующего действия дофамина. Выводы: особенности строения сетчатки крыс DAT-KO позволяют рекомендовать их для экспериментов при разработке методов лечения дегенеративных заболеваний глаз.

**Ключевые слова:** ультраструктура сетчатки, крысы линии DAT-KO, дофаминовый транспортер, дегенеративные заболевания глаз

## **ELECTRON MICROSCOPIC EXAMINATION OF THE RETINA OF DAT-KO RATS**

Musina L.A.<sup>1\*</sup>, Khismatullina Z.R.<sup>2</sup>, Shangina O.R.<sup>1</sup>, Lebedeva A.I.<sup>1</sup>, Gainetdinov R.R.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

<sup>3</sup> Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>4</sup> St. Petersburg University Hospital, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, Санкт-Петербург, Россия

\* morphoplant@mail.ru

The purpose of the study. To study the ultrastructure of the inner retinal layers of DAT-KO rats in comparison with the retina of Wistar rats. Material and methods. The retina of sexually mature Wistar (4 eyes) and DAT-KO (10 eyes) rats without a dopamine transporter was examined by scanning electron microscopy. Results. Ultrastructural changes in the inner layers of the retina were revealed in rats of the DAT-KO line in the form of signs of dystrophic and destructive processes, which may be a sign of the development of degenerative retinal disease against the background of a violation of the modulating action of dopamine. Conclusions. The structural features of the retina of DAT-KO rats make it possible to recommend them for experiments in the development of methods for the treatment of degenerative eye diseases.

**Keywords:** retinal ultrastructure, DAT-KO rats, dopamine transporter, degenerative eye disease

### **Актуальность**

Дофамин продуцирующие нейроны и рецепторы к дофамину имеются во всех структурных образованиях глаза, в том числе и в сетчатке, являющейся «продолжением» головного мозга [1, 2]. Относительно недавно была создана линия крыс DAT-KO нокаутированных по гену дофаминового транспортера [3]. Отсутствие переносчика дофамина в ткани мозга у них проявляется двигательной гиперактивностью и когнитивными нарушениями [3, 4, 5]. Сетчатка глаза у крыс данной линии еще не изучена. Так как сетчатая оболочка глаза имеет сложное строение и состоит из десяти слоев, наши исследования были разделены на несколько этапов и первым из них стало изучение ультраструктуры внутренней части сетчатки, содержащей разные виды нейронов. Цель нашего исследования – изучить ультраструктуру внутренних слоев сетчатки глаза крыс линии DAT-KO в сравнении с сетчаткой крыс линии Wistar.

## **Материалы и методы**

Из фиксированных в 10% р-ре формалина (24 часа) глазных яблок половозрелых крыс (6 месяцев) линии Wistar (4 глазных яблока) и DAT-KO (10 глазных яблок) вырезали кусочки сетчатки вместе со склерой и сосудистой оболочкой в центральной и средней зоне. Фиксировали в 2,5% р-ре глутаральдегида на какодилатном буфере (рН 7,2–7,4) с последующей постфиксацией в 1% р-ре OsO<sub>4</sub>, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (этанол) и абсолютном ацетоне; заливали в смолу эпон-812. На ультрамикротоме LKB-III 8800 (Швеция) готовили ультратонкие срезы, контрастировали в 2%-ном водном р-ре уранилацетата и цитрате свинца по Рейнольдсу. Срезы исследовали и фотографировали в просвечивающем электронном микроскопе Jem-1011 (Япония, JEOL) при увеличениях 2500–20000.

## **Результаты и обсуждение**

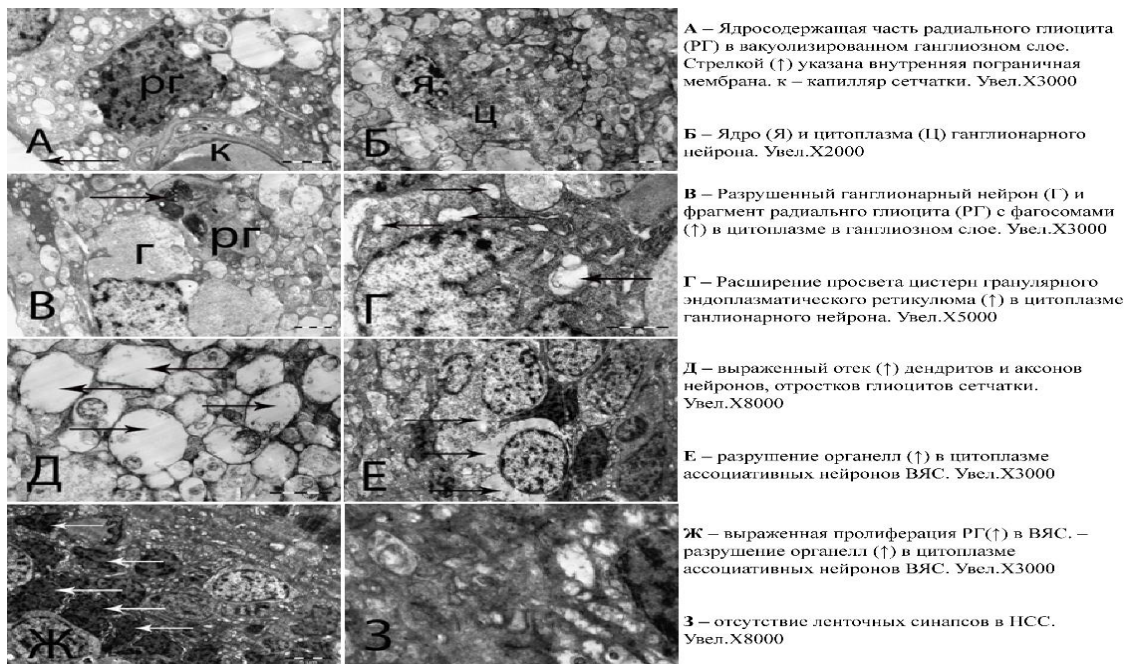
Сетчатая оболочка глаз половозрелых крыс линии Wistar имеет строение подобное таковой других млекопитающих. Ни в одном из слоев исследованной сетчатки признаков патологических изменений в виде вакуолизации цитоплазмы, деструкции органелл в ней и разрушения клеток нами не выявлено. Клетки пигментного эпителия, фоторецепторные нейроны, все клетки внутреннего ядерного слоя (ВЯС) – это ассоциативные биполярные, горизонтальные и амакриновые нейроны, ганглионарные (мультиполярные) нейроны ганглиозного слоя, а также клетки радиальной глии (Мюллеровские глиоциты) между нейронами, кровеносные капилляры сетчатки имели типичную для них ультраструктуру, предполагающую правильное функционирование сетчатки. Об этом свидетельствовало и большое количество характерных для сетчатки лентовидных (ЛС) и плоских синапсов в наружном сетчатом (плексиморфном) слое (НСС).

В сетчатке половозрелых крыс линии DAT-KO в отличие от таковой крыс Wistar нами были обнаружены многочисленные признаки ультраструктурных изменений. Внутренняя пограничная мембрана сетчатки, формируемая внутренними отростками радиальных глиоцитов (РГ) была нечетко очерченной, а цитоплазма отростков глиоцитов обильно вакуолизированной. В данном слое, содержащей множество светлых вакуолей, нетипично для сетчатки определялись единичные ядродержащие части РГ, хотя обычно они содержатся во ВЯС сетчатки (рис. 1А). Этот факт может свидетельствовать о пролиферации глиоцитов, которая обычно выявляется при патологии в случае разрушения нейронов [6].



Цитозоль и внутриклеточные органеллы в большинстве ганглионарных нейронов подвергались выраженной деструкции. Очертания нейронов четко не просматривались, цитоплазма была опустошенной, очень светлой, одновременно неоднородной, ядра уменьшались в размерах (рис. 1Б). Рядом с разрушенными ганглионарными нейронами выявлялись фрагменты глиоцитов, в цитоплазме которых определялись многочисленные гетерогенные фаголизосомы (рис. 1В). В сохранившихся ганглионарных нейронах определялись признаки довольно выраженной гидропической дистрофии в виде вакуолизации митохондрий с разрушением крист. Расширение просвета цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, слущивание с них рибосом, а также уменьшение в цитоплазматическом матриксе свободных рибосом и полисом свидетельствовало о нарушении белкового обмена в клетке (рис. 1Г). Ядра их содержали незначительное количество гетерохроматина на внутренней поверхности кариолеммы.

Внутренний сетчатый слой (ВСС) между ганглиозным и внутренним ядерным слоем (ВЯС) был с признаками выраженного отека дендритов и аксонов нервных клеток, а также отростков глиоцитов сетчатки (рис. 1Д). Органеллы в них и четкие синаптические контакты между нейронами в этом слое встречались очень редко. Ассоциативные нейроны ВЯС также подвергались довольно выраженным деструктивным процессам (рис. 1Е). Вследствие разрушения внутриклеточных органелл в цитоплазме по ультраструктурным признакам нейроны не представлялось возможным дифференцировать. ВЯС терял свою характерную архитектуру, так как в отдельных участках определялась выраженная пролиферация РГ (рис. 1Ж). Тела их выявлялись в данном слое в значительном количестве, что не свойственно для нормы. Вероятно пролиферирующие РГ замещали собой разрушающиеся нейроны ВЯС. При этом цитоплазма глиоцитов нетипично была сильно вакуолизированной, у многих клеток определялось расширение перинуклеарного пространства. В НСС не выявлялись специфические для сетчатки глаза ЛС между ассоциативными и фоторецепторными нейронами (рис.13). Уменьшение количества плоских синапсов и исчезновение ЛС может указывать на нарушение правильной работы зрительного анализатора у крыс изучаемой линии [7].



*Рис. 1.* Ультраструктура сетчатки глаза половозрелой крысы линии DAT-KO

Таким образом, у половозрелых крыс линии DAT-KO нами были выявлены довольно выраженные изменения ультраструктурной организации внутренних слоев сетчатки глаза. Описанная морфологическая картина сетчатки непременно должна сопровождаться ослаблением функциональных параметров зрительного анализатора. Известно, что эта линия животных отличается повышенной концентрацией внеклеточного дофамина в синапсах нервной ткани вследствие генетического дефицита его переносчика [3]. Полноценно функционирующие дофаминергические сигнальные пути имеют большое значение для поддержания физиологических процессов в нервной ткани, а несбалансированная активность медиатора приводит к дисфункциям, которые вызывают дегенеративные процессы в нервной ткани [8]. Модели трансгенных животных позволяют изучать механизмы развития и лечения многих болезней человека. Полученные нами результаты предварительны, и они логично ставят перед нами в ближайшем будущем задачи для более углубленного изучения внутренних слоев сетчатки крыс линии DAT-KO и структуры наружных слоев сетчатки, к которым относятся фоторецепторные нейроны и клетки пигментного эпителия сетчатки.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

1. Cavallotti C., Pescosolido N. Localization of dopamine receptors in the rabbit cornea // *Cornea*. 1999. Vol. 18. № 6. Pp. 721–728. <https://doi.org/10.1097/00003226-99911000-00016>.
2. Firsov M.L., Astakhova L.A. The Role of Dopamine in Controlling Retinal Photoreceptor Fun 2. Pp.138–145. <https://doi.org/10.1007/s11055-015-0210-9>.
3. Leo D., Sukhanov I., Zoratto F., Illiano P., Caffino L., Sanna F., Messa G., Emanuele M., Esposito A., Dorofeikova M., Budygin E.A., Mus L., Efimova E.E., Niello M., Espinoza S., Sotnikova T.D., Hoener M.C., Laviola G., Fumagalli F., Adriani W., Gainetdinov R.R. Pronounced hyperactivity, cognitive dysfunctions and BDNF dysregulation in dopamine transporter knockout rats // *J. Neurosci*. 2018. Vol. 38. Pp. 1959–1972.
4. Федорова А.М., Давлетбаева А.Р., Хисматуллина З.Р. Исследование электрической активности мозга у крыс с гипо- и гиперфункцией дофаминергической системы при воздействии хронического стресса // *Нейронаука для медицины и психологии: XIX Международный междисциплинарный конгресс*. Судак, Крым, Россия; 30 мая – 10 июня 2023 г.: Труды Конгресса / под ред. Е.В. Лосевой и Н.И. Хорсейвой – Москва: МАКС Пресс, 2023. С. 288–289.
5. Давлетбаева А.Р., Федорова А.М., Хисматуллина З.Р. Исследование уровня эмоционально – поведенческой реактивности животных на фоне воздействия хронического стресса // *Нейронаука для медицины и психологии: XIX Международный междисциплинарный конгресс*. Судак, Крым, Россия; 30 мая – 10 июня 2023 г.: Труды Конгресса / Под ред. Е.В. Лосевой и Н.И. Хорсейвой – Москва: МАКС Пресс, 2023. С. 99.
6. Pierdomenico J. Di., Martínez-Vacas A., Hernández-Muñoz D., Gómez-Ramírez A.M., Valiente-Soriano F.J., Agudo-Barriuso M. et al. Coordinated Intervention of Microglial and Müller Cells in Light-Induced Retinal Degeneration // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2020. Vol. 61. No 3. P.p. 47-47.
7. Вит В.В. Строение зрительной системы человека / В.В. Вит – Одесса: Астропринт. 2003. 664 с.
8. Циркин В.И., Багаев В.И., Бейн Б.Н. Роль дофамина в деятельности мозга (обзор литературы) // *Вятский медицинский вестник*. 2010. № 1. <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-dofamina-v-deyatelnosti-mozga-obzor-literatury>.

© Мусина Л.А., Хисматуллина З.Р., Шангина О.Р.,  
Лебедева А.И., Гайнетдинов Р.Р., 2024

## **РЕАЛЬНЫЙ КРЫЛОНЕБНЫЙ УЗЕЛ, ЕГО СВЯЗИ И РАЗМЕЩЕНИЕ В КРЫЛОВИДНО-НЕБНОЙ ЯМКЕ**

Прокофьев А.С.\* , Макеева Е.А., Митрохина Е.О.

Российский университет медицины Министерства здравоохранения  
Российской федерации, Москва, Россия

\* prokofev\_aleksandr83@mail.ru

Цель исследования: изучить строение и положение крылонебного узла в свете новых анатомических данных, в связи с тем, что его описание в современных учебниках не соответствует новым данным о строении парасимпатических узлов головы человека. Были изучены макромикропрепараты, импрегнированные нитратом серебра, компьютерные и магнитно-резонансные томограммы, а также гистотопограммы. Установлено, что крылонебный узел залегает в преддверии крыловидного канала и посылает ветви к заднему верхнему носовому нерву; его корнем является только большой каменистый нерв, а глубокий каменистый нерв в канале и крыловидно-небной ямке пролегает отдельно от него и от крылонебного узла.

**Ключевые слова:** крылонебный узел, крыловидно-небная ямка, большой каменистый нерв, глубокий каменистый нерв

## **THE REAL PTERYGOPALATINE GANGLION, ITS CONNECTIONS AND LOCATION IN THE PTERYGOMAXILLARY FOSSA**

Prokofev A.S.\* , Makeeva E.A., Mitrokhina E.O.

Russian University of Medicine of the Ministry of Health of the Russian  
Federation, Moscow, Russia

\* prokofev\_aleksandr83@mail.ru

Purpose of the study: to study the structure and position of the pterygopalatine ganglion in the light of new anatomical data, due to the fact that its description in modern textbooks does not correspond to new data on the structure of the parasympathetic ganglions of the human head. Macro- and micropreparations impregnated with silver nitrate, computer and magnetic resonance scans, as well as histotopograms were studied. It was found that the pterygopalatine ganglion lies in the vestibule of the pterygoid canal and sends branches to the posterior superior nasal nerve; its root is only the greater petrosal nerve, and the deep petrosal nerve in the canal and the pterygopalatine fossa lies separately from it and from the pterygopalatine ganglion.

**Keywords:** pterygopalatine ganglion, pterygopalatine fossa, greater petrosal nerve, deep petrosal nerve

## Актуальность

В последние десятилетия отмечается рост числа посвященных крылонёбному узлу публикаций, в которых этот узел рассматривается в качестве важнейшего фактора в патогенезе лицевых болей [1–3]. Предположение о ведущей роли крылонёбного узла высказал Sluder в 1908 году [4], когда узлы головы, известные сегодня как парасимпатические, считались узлами симпатического ствола, вынесенными на голову. Поэтому лицевым болям соответствовал термин «симпаталгии».

Хотя к настоящему времени понимание патогенеза кластерных головных болей принципиально изменилось, роль крылонебного узла в этом процессе сохранилась [5], и многочисленные авторы современных публикаций сообщают о разных способах воздействия на него при лечении головных и лицевых болей [1–2, 5–9]. При этом способы доступа к крылонебному узлу разрабатываются с опорой на его описание, однотипно изложенное во всех учебниках и руководствах и мало отличающееся от того, что в свое время представил F. Arnold (1853) [10].

По общему мнению, узел, в соответствии с «законом» F-A. Longet (1842) [11], имеет парасимпатический, симпатический и чувствительный корни и отдает небные, задние верхние носовые и некоторые более мелкие ветви. Узел располагается в крыловидно-нёбной ямке, а, поскольку она, также по общему мнению, имеет щелевидную форму или форму пятигранной пирамиды [12], он занимает в ямке центральное положение в створе клиновидно-нёбного отверстия и крыловидно-верхнечелюстной щели [13, 14].

Последующие немногочисленные анатомические работы по строению и положению крылонёбного узла отмечают его незначительные индивидуальные различия в пределах все той же схемы. Обращает на себя внимание тот факт, что авторы [14], изучая положение крылонебного узла на аксиальных магнитно-резонансных томограммах, обозначают его положение латеральнее клиновидно-нёбного отверстия, то есть там, где он «должен быть», но не там, где он есть. Такова сила традиции.

В конце XX-начале XXI веков группа авторов под руководством академика Л.Л. Колесникова [15–22] на основании собственных и литературных данных опровергла указанную схему строения парасимпатического узла головы в отношении ресничного, ушного и поднижнечелюстного узлов.

Цитируемые авторы пришли к заключению, что парасимпатический узел головы человека и животных (кроме рыб и земноводных) представляет собой скопление тел нейронов на конце парасимпатического нерва и отдает ветви к ближайшим ветвям тройничного нерва и к тканям-мишеням.

Парасимпатический тракт присоединяется к ранее возникшему в ходе эволюции чувствительному тракту проксимальнее или дистальнее узла в зависимости от формы черепа, определяемой условиями экологической ниши. В связи с этим у парасимпатического узла: а) чувствительный корень

может образоваться, и тогда его волокна пролегают среди нейронов узла, или, б) такой корень не образуется, и тогда волокна узла входят в ветви тройничного нерва.

В то же время симпатические волокна достигают ткани-мишени по ходу артерий, минуя парасимпатический узел.

Целью нашего исследования определено рассмотрение с новых позиций, с опорой на новую методологию, строения крылонёбного узла человека и его размещения в крыловидно-нёбной ямке.

### Материалы и методы

Строение крылонёбного узла изучено нами на 40 макромикропрепаратах, импрегнированных нитратом серебра по Хрисенсену, и интактных, на 16 гистотопограммах, а также на 46 магнитно-резонансных томограммах, а форма крыловидно-нёбной ямки – на 138 компьютерных томограммах. Всего изучено 240 объектов.

При изготовлении макромикропрепаратов, импрегнированных нитратом серебра, использовано просветление объекта в глицерине, что позволило не удалять соединительную ткань в непосредственной близости от тонких нервных стволиков.

### Результаты и обсуждение

Изучение компьютерных томограмм позволяет констатировать, что крыловидно-нёбная ямка имеет более сложную форму, чем щель или пирамида. В полости ямки естественным образом выделяются центральная, наиболее вместительная часть, прилежащая с латеральной стороны к клиновидно-нёбному отверстию, и три воронкообразных сужения, ведущих в крыловидный канал (преддверие крыловидного канала), в большой небный канал (преддверие большого небного канала) и в крыловидно-верхнечелюстную щель (преддверие крыловидно-верхнечелюстной щели) (рис. 1).

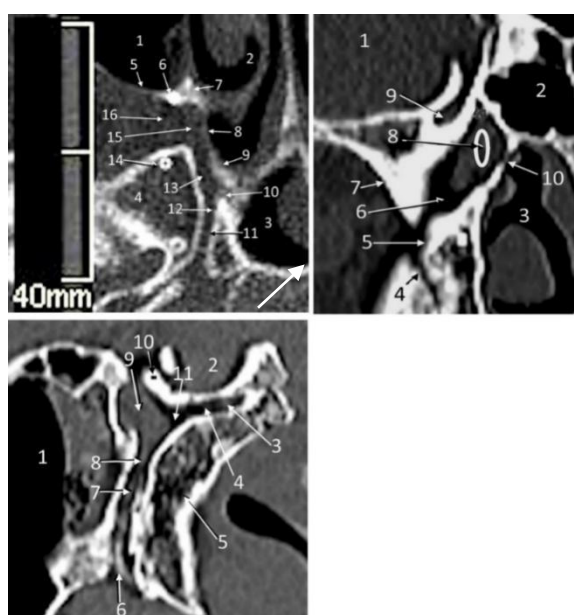


Рис. 1. Детали строения крыловидно-нёбной ямки на аксиальной (А), фронтальной (Б) и сагиттальной (В) компьютерных томограммах

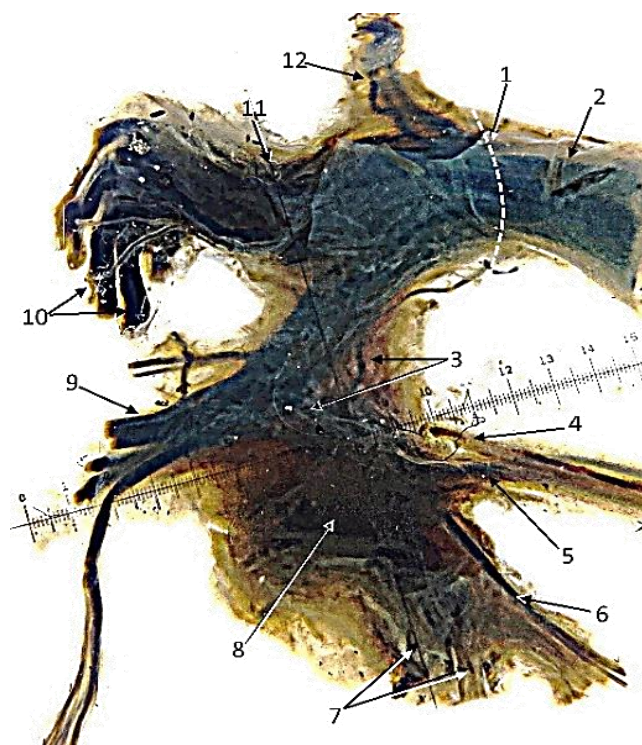
*Примечание к рисунку 1(А).* Аксиальная томограмма на уровне крыловидного канала: 1. Полость глазницы; 2. Полость носа; 3. Клиновидная пазуха; 4. Большое крыло клиновидной кости; 5. Передняя стенка крыловидно-нёбной ямки; 6. Проекция устья большого нёбного отверстия; 7. Глазничный отросток нёбной кости; 8. Клиновидно-нёбное отверстие; 9. Клиновидный отросток нёбной кости; 10. Нёбно-влагалищный канал; 11. Крыловидный канал; 12. Переднее отверстие крыловидного канала; 13. Место расположения крылонёбного узла; 14. Проекция круглого отверстия; 15. Центральная часть крыловидно-нёбной ямки; 16. Преддверие крыловидно-верхнечелюстной щели. *Б.* Фронтальная томограмма на уровне заднего края клиновидно-нёбного отверстия: 1. Средняя черепная ямка; 2. Клиновидная пазуха; 3. Полость носа; 4. Проекция устья большого нёбного канала; 5. Крыловидный отросток; 6. Преддверие крыловидно-верхнечелюстной щели; 7. Большое крыло клиновидной кости; 8. Место расположения крылонёбного узла в преддверии крыловидного канала; 9. Круглое отверстие. *В.* Сагиттальная томограмма на уровне крыловидного канала: 1. Верхнечелюстная пазуха; 2. Средняя черепная ямка; 3. Крыловидный канал; 4. Переднее отверстие крыловидного канала; 5. Крыловидный отросток; 6. Большое нёбное отверстие; 7. Большой нёбный канал; 8. Преддверие большого нёбного канала; 9. Центральная часть крыловидно-нёбной ямки; 10. Дно клиновидной пазухи; 11. Место расположения крылонёбного узла в преддверии крыловидного канала.

Наличие в полости крыловидно-нёбной ямки преддверия крыловидного канала обусловлено расположением его переднего отверстия не только медиально и книзу, но и намного кзади от круглого отверстия. А это позволило нам предположить, что крылонёбный узел располагается именно в преддверии крыловидного канала, позади заднего края клиновидно-нёбного отверстия, то есть ниже, медиальнее и позади задних верхних носовых нервов.

Это предположение подтверждается макромикроскопическими препаратами, на которых крылонёбный узел определяется либо прилежащим сзади и снизу к задним верхним носовым нервам при магистральной форме нервов в крыловидно-нёбной ямке и концентрированной форме узла, либо находится на расстоянии 1–2 мм от задних носовых и нёбных нервов при рассыпной форме нервов и узла.

На импрегнированных нитратом серебра по Христенсену и просветлённых в глицерине макромикропрепаратах, кроме того видны множественные тонкие соединительные ветви в узком промежутке между крылонёбным узлом и задним верхним носовым нервом (рис. 2).





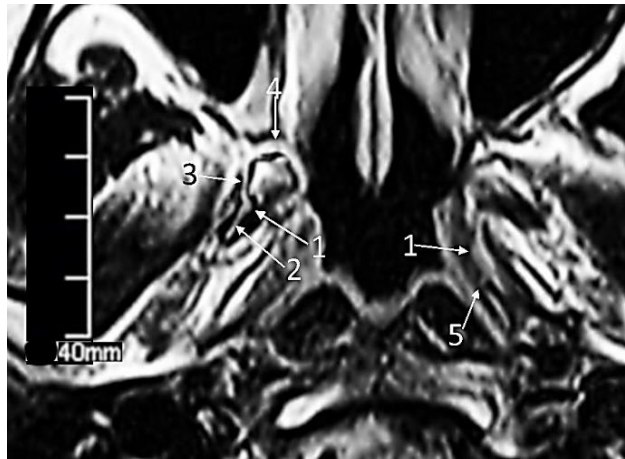
*Рис. 2.* Нервы в крыловидно-небной ямке. Изолированный препарат, импрегнированный нитратом серебра по Христенсену. Увеличение 10 раз. Фотография в проходящем и отраженном свете. В качестве линейки использован окуляр-микрометр от микроскопа. Цена деления 0,1 мм

*Примечание к рисунку 2.* 1. Круглое отверстие; 2. Верхнечелюстной нерв в круглом отверстии; 3. Соединительные ветви между задним верхним носовым нервом (9) и крылонебным узлом (8); 4. Глубокий каменистый нерв; 5. Большой каменистый нерв; 6. Глоточный нерв; 7. Глазничные ветви крылонебного узла; 10. Большой небный нерв; 11. Верхнечелюстной нерв в крыловидно-небной ямке; 12. Скуловой нерв.

На таких препаратах крылонебный узел обычно имеет форму неправильного треугольника с закругленными вершинами. Сзади или сзади сверху к узлу подходит большой каменистый нерв, а от медиальной поверхности узла отходят глоточный нерв, следующий в нёбно-влагалищный канал, и множество тонких ветвей, которые, с учетом данных литературы [23], могут быть обозначены медиальными глазничными ветвями.

На аксиальных магнитно-резонансных томограммах, когда срез проходит в плоскости крыловидного канала, крылонёбные узлы отчетливо выражены в пределах преддверия крыловидного канала (рис. 3).





*Рис. 3.* Крылонебные узлы в преддверии крыловидных каналов. Аксиальная магнитно-резонансная томограмма. Мужчина, 56 лет

*Примечание к рисунку 3.* 1. Крылонебные узлы; 2. Содержимое крыловидного канала; 3. Ветвь от крылонебного узла к заднему верхнему носовому нерву (4); 5. Глоточный нерв.

То, что крылонебный узел располагается в преддверии крыловидного канала, хорошо видно и на гистотопограммах в горизонтальной плоскости (рис. 4): нерв пролегает в костном канале, а узел расположен кпереди от его переднего отверстия.



*Рис 4.* Положение крыловидного узла в преддверии крыловидного канала. Гистотопограмма, гематоксилин-эозин, увеличение 7x10. Женщина, 40 лет

*Примечание к рисунку 4.* 1. Задний полюс крылонебного узла; 2. Костная ткань крыловидного отростка; 3. Надкостница преддверия крыловидного канала; 4. Большой каменистый нерв в крыловидном канале; 5. Тела нейронов в большом каменистом нерве; 7. Надкостница преддверия крыловидного канала.

Анализ макромикропрепаратов, магнитно-резонансных томограмм и гистотопограмм подтверждает наличие очень тонких и коротких ветвей, соединяющих крылонёбный узел с задними верхними носовыми нервами (рис. 2, 3). И только гистотопограммы (рис. 5) позволяют оценить эти соединительные ветви не как чувствительные корни узла, а как ветви узла к чувствительному нерву, так как они содержат в большом количестве тела нейронов.



Рис. 5. Гистотопограмма содержимого крыловидно-нёбной ямки (монтаж). Гематооксимлин-эозин, увеличение 7x10. Мужчина, 65 лет

На гистотопограмме (рис. 5), выполненной в горизонтальной плоскости, виден верхнечелюстной нерв (1), с отходящими от него задними верхними носовыми нервами (8). Последние идентифицируются по тому, что они вместе с клиновидно-нёбной артерией (7) уходят из крыловидно-нёбной ямки под слизистую оболочку полости носа (6). У заднего края задних носовых нервов виден фрагмент крылонёбного узла (4) и отходящие от него ветви к задним верхним носовым (5) и к верхнечелюстному нервам (3). Эти ветви содержат тела нейронов. Последнее обстоятельство убеждает в том, что это ветви узла к чувствительным нервам, а не чувствительные корни узла.

Глубокий каменистый нерв в крыловидном канале пролегает отдельно от большого каменистого нерва (рис. 2), как в свое время отметил F. Arnold (1851) [10], а в преддверии крыловидного канала пучки его волокон отделяются от клеточной массы узла тонкой капсулой последнего. Они не составляют корня крылонебного узла и, по данным литературы [23], формируют латеральные глазничные ветви.

## **Заключение**

Обобщая полученные данные, мы представляем новую схему строения и положения крылонёбного узла.

Крылонёбный узел – совокупность тел нейронов, принимающая волокна большого каменистого нерва – залегает в преддверии крыловидного канала так, что его передний полюс находится на 0,5–2 мм позади клиновидно-нёбного и круглого отверстий, а задний полюс – в переднем отверстии крыловидного канала. С латеральной стороны он прикрыт крыловидным отростком.

От переднего полюса крыловидного узла к задним верхним носовым и верхнечелюстному нервам направляются ветви узла, содержащие тела нейронов. В отличие от общепринятой схемы, имеют место не чувствительные волокна к узлу (чувствительный корень узла), а парасимпатические волокна к верхнечелюстному нерву, аналогичные серым соединительным ветвям узлов симпатического ствола. От узла отходят также глоточный нерв, уходящий в небо-влагалищный канал, и группа тонких ветвей, идущих в направлении медиальной стенки глазницы. На основании данных литературы [24], эти ветви можно определить, как медиальные глазничные.

В таком виде, как крылонёбный узел представлен в результате наших исследований, его участие в патогенезе кластерных головных и лицевых болей ставится под сомнение, тем более, что в качестве лечебных мероприятий с одинаковым успехом или неуспехом применяются такие противоположные действия как его разрушение или стимуляция, которые, в свете полученных нами данных, лишаются анатомического обоснования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## **Список литературы**

1. Lundy J.A., McNary T. Neuroanatomy, Pterygopalatine Ganglion. // 2023 Jul 24. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.
2. Jamtøy K.A., Thorstensen W.M., Stovner L.J., Rosén A., Maarbjerg S., Bratbak D., Simpson M.R., Tronvik E. Onabotulinum toxin a block of the sphenopalatine ganglion in patients with persistent idiopathic facial pain: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, exploratory, cross-over study. // Cephalalgia. 2023. Vol. 43. №7. doi:3331024231187132.
3. Dwivedi P., Singh P., Patel T.K., Bajpai V., Kabi A., Singh Y., Sharma S., Kishore S. Trans-nasal sphenopalatine ganglion block for post-dural puncture headache management: a meta-analysis of randomized trials. // Braz J. Anesthesiol. 2023. Vol. 73. № 6. Pp.782–793.
4. Sluder G. The role of the sphenopalatine ganglion in nasal headaches. // AR Elliott Publishing Company. N Y State J Med. 1908. № 27. Pp. 8–13.

5. Сероусова О.В., Карпова М.И. Тригеминальные автономные цефалгии: особенности диагностики и лечения. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2021. Т. 121. № 10. С. 105–112.
6. Abdelhaleem Abdelhaleem N.F. Verification of Sphenopalatine Ganglion Block Success Using Transcranial Doppler in Management of Patients with Postdural. // Pain Physician. 2021. Vol. 24. № 5.
7. Zanella S., Buccelletti F., Franceschi F., Vassiliadis A., Ramponi C., Sivolella S., Zanoni A., Lumachi F. Transnasal sphenopalatine ganglion blockade for acute facial pain: a prospective randomized case-control study. // Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018. Vol. 22. № 1. Pp. 210–216.
8. Smita S., Dubey P.K., Singh K. Intranasal sphenopalatine ganglion block by lignocaine spray for postdural puncture headache following spinal anesthesia: a randomized clinical trial // Anaesthesiol Intensive Ther. 2023. Vol. 55. № 4. Pp. 285–290.
9. Jespersen M.S., Jaeger P., Ægidius K.L., Fabritius M.L., Duch P., Rye I., Afshari A., Meyhoff C.S. Sphenopalatine ganglion block for the treatment of postdural puncture headache: a randomised, blinded, clinical trial. // Br J Anaesth. 2020. Vol. 124. № 6. Pp. 739–747.
10. Arnold F. Handbuch der Anatomie des Menschen mit besonderer Rücksicht auf Physiologie und praktische. Medicin (Medizin). 1851: Mit Abbildungen. Bände 2 (Abtheilungen 2) vollständig in 3 Bänden.
11. Longet F.-A. Anatomie et physiologie système nerveux du de l'homme et des animaux vertébrés; ouvrage contenant des observations pathologiques relatives au système nerveux et des expériences sur les animaux des classes supérieures. Avec planches. Tome second. Paris. Chez Fortin, Masson et co, Place de l'école-de-médecine. 1842. Pp. 120–125.
12. Erdogan N., Erdogan U., Baykaraa M. CT anatomy of pterygopalatine fossa and its communications: A pictorial review. // Computerized medical imaging and graphics: the official journal of the Computerized Medical Imaging Society. 2003. Vol. 27. № 6. Pp. 481–487.
13. Олещенко И.Г. Регионарная анестезия при оперативном лечении врожденной катаракты у детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2018.
14. Crespi J., Bratbak D., Dodick D., Matharu M., Jamtoy K.A., Aschehoug I., and Tronvik E. //Measurement and implications of the distance between the sphenopalatine ganglion and nasal mucosa: a J Headache Pain. 2018. Vol. 19. № 1. Pp.14.
15. Аллямова Л.М. Особенности кровоснабжения и иннервации слёзной и гардеровой желёз белой крысы в эмбриогенезе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 2011.
16. Майоров Л.А. Анатомические особенности ушного узла взрослого человека: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1997. 16 с.
17. Макеева Е.А. Развитие околоушной слюнной железы, путей ее иннервации и кровоснабжения: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2010. 16 с.

18. Невский М.С. Морфологические особенности поднижнечелюстной слюнной железы белой крысы в эмбриогенезе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Саранск. 2012. 16 с.

19. Полойко Т.В. Морфологические особенности ресничного узла человека и некоторых животных (анатомио-экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2000.

20. Рыльская О.В. Морфологические особенности вегетативных узлов слюнных желез; автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1999. 27 с.

21. Цыбульский А.Г. Морфология ресничного узла человека и некоторых представителей позвоночных (анатомио-экспериментальное исследование): автореф. дис. ... док. мед. наук. М., 2005.

22. Цыбульский А.Г., Колесников Л.Л., Полойко Т.В. Некоторые итоги анатомио-экспериментальных исследований вегетативных узлов головы // Журнал Российские Морфологические Ведомости. 2000. № 1–2. С.125–129.

23. Ruskell GL, Orbital passage of the pterygopalatine ganglion to paranasal sinuses and nasal mucosa in man. // Cell Tissues Organs. 2003. Vol. 175. № 4. Pp. 223–228.

24. Ruskell GL Distribution of the pterygopalatine ganglion efferents to lacrimal gland in man. // Exp. Eye Res. 2004. Vol. 78. № 3. Pp. 329-335.

© Прокофьев А.С., Макеева Е.А., Митрохина Е.О., 2024

УДК 615.31

## **МЕЖАТОМНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СТРУКТУРАХ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ**

Пушкин Д.В.<sup>\*</sup>, Савченков А.В.

Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королёва, г. Самара, Россия

<sup>\*</sup> pushkin.dv@ssau.ru

С целью усиления контроля получения определенных полиморфных модификаций активных фармацевтических ингредиентов были проанализированы межатомные взаимодействия для двух высокополиморфных химических соединений в рамках стереоатомной модели строения кристаллов. В качестве соединений были рассмотрены антипсихотические вещества арипипразол и ROY, являющийся прекурсором для синтеза оланзапина. Было показано, что каждая полиморфная модификация обладает уникальной системой межатомных взаимодействий, отличной от таковой в других имеющихся модификациях. Также были установлены некоторые корреляции между особенностями

межатомных взаимодействий с одной стороны, и проявляемыми макро свойствами с другой стороны.

**Ключевые слова:** активные фармацевтические ингредиенты; межатомные взаимодействия; арипипразол; оланзапин; полиэдры Вороного–Дирихле

## INTERATOMIC INTERACTIONS IN THE STRUCTURES OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS

Pushkin D.V. \*, Savchenkov A.V.

Samara National Research University, Samara, Russia

\* pushkin.dv@ssau.ru

In order to enhance control over obtaining certain polymorphic modifications of active pharmaceutical ingredients, interatomic interactions were analyzed for two highly polymorphic chemical compounds within the framework of the stereoisomeric model of crystal structures. The compounds considered were the antipsychotic substances aripiprazole and ROY, which is a precursor for the synthesis of olanzapine. It was shown that each polymorphic modification realizes a unique system of interatomic interactions, different from that in other existing modifications. Some correlations were also established between the features of interatomic interactions on the one hand, and the manifested macro properties on the other hand.

**Keywords:** active pharmaceutical ingredients; atomic interactions; aripiprazole; olanzapine; Voronoi–Dirichlet polyhedra

### Актуальность

Активные фармацевтические ингредиенты часто представляют собой органические химические соединения, молекулы которых имеют нежесткие каркасы. Этот факт приводит к существованию нескольких полиморфных форм одного и того же химического соединения, что в значительной степени затрудняет использование соответствующих лекарственных препаратов в фармацевтике. Одним из самых известных подобных примеров является ритонавир [1, 2].

Для решения данной проблемы на сегодняшний день применяется так называемый полиморфный скрининг, позволяющий заблаговременно выявить как можно большее количество полиморфных модификаций химических веществ. Одной из сопутствующих стадий является описание обнаруженных модификаций, в том числе с точки зрения их строения и реализуемых межатомных взаимодействий. Однако, эта задача нетривиальна, т.к. не существует общепринятого и полноценного метода оценки данных характеристик. Тем не менее, выявление различий в межатомных взаимодействиях в различных полиморфных модификациях могло бы способствовать установлению корреляции таких различий



с проявляемой биологической активностью, которая может различаться у разных модификаций.

Цель работы: разработать методы объективного и количественного описания межатомных взаимодействий в структурах кристаллов и провести их апробацию на примере активных фармацевтических ингредиентов.

### Материалы и методы

Для достижения указанной цели использовались подходы в рамках стереоатомной модели строения кристаллов [3], основывающейся на построении полиэдров Вороного–Дирихле для атомов биологически активных молекул, которая ранее хорошо зарекомендовала себя при рассмотрении различных других объектов.

### Результаты и обсуждение

В качестве объектов для исследования были выбраны арипипразол (APZ, 7-[4-[4-(2,3-дихлорфенил)-1-пиперазинил]бутокси]-3,4-дигидро-2(1H)-хинолинон), который используется в качестве антидепрессанта и атипичного антипсихотического средства [4], а также вещество с тривиальным названием ROY (5-метил-2-[(2-нитрофенил)-амино]-3-тиофенкарбонитрил), являющееся прекурсором для производства антипсихотического препарата – оланзапина [5] (рис. 1).

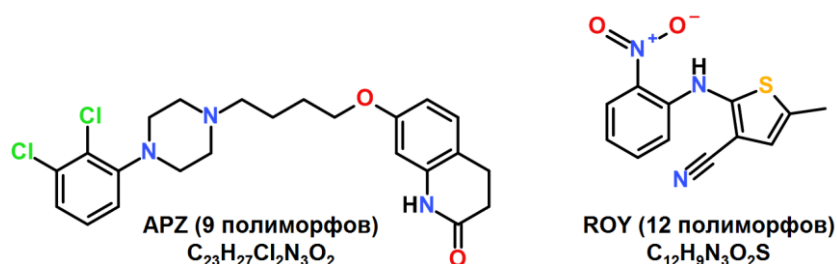


Рис. 1. Структурные формулы арипипразола (APZ) и ROY

В результате для каждой из рассмотренных полиморфных модификаций были установлены количественные характеристики всех без исключения межатомных взаимодействий. Было показано, что каждая полиморфная модификация обладает уникальной системой межатомных взаимодействий, отличной от таковой в других имеющихся модификациях. Были введены новые инструменты для облегчения анализа полиморфных модификаций. Также были установлены некоторые корреляции между особенностями межатомных взаимодействий с одной стороны, и проявляемыми макро свойствами с другой стороны (в частности, изменение цвета некоторых модификаций ROY при атмосферном и повышенном давлении).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Chemburkar S.R., Bauer J., Deming K., Spiwek H., Patel K., Morris J., Henry R., Spanton S., Dziki W., Porter W., Quick J., Bauer P., Donaubaauer J., Narayanan B. A., Soldani M., Riley D., McFarland K. Dealing with the Impact of

Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development // *Org. Process Res. Dev.* 2000. Vol. 4. No. 5. Pp. 413–417.

2. Neumann M.A.; van de Streek J. How many ritonavir cases are there still out there? // *Faraday Discuss.* 2018. Vol. 211. Pp. 441–458.

3. Shevchenko A.P., Serezhkin V. N. Stereoatomic Model and Structure of Saturated Hydrocarbon Crystals // *Russ. J. Phys. Chem.* 2004. Vol. 78. No. 10. Pp. 1598–1606.

4. Zeidan T.A., Trotta J.T., Tilak P.A., Oliveira M.A., Chiarella R.A., Foxman B.M., Almarsson Ö., Hickey M.B. An Unprecedented Case of Dodecamorphism: The Twelfth Polymorph of Aripiprazole Formed by Seeding with Its Active Metabolite // *CrystEngComm.* 2016. Vol. 18. Pp. 1486–1488.

5. Reutzel-Edens S.M., Bhardwaj R.M. Crystal Forms in Pharmaceutical Applications: Olanzapine, a Gift to Crystal Chemistry That Keeps on Giving // *IUCrJ.* 2020. Vol. 7. No. 6. Pp. 955–964.

© Пушкин Д.В., Савченков А.В., 2024

УДК 577.29

## **АНАЛИЗ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ СОСУДИСТОГО СПЛЕТЕНИЯ ТРЕТЬЕГО ЖЕЛУДОЧКА МОЗГА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ У КРЫСЫ SPRAGUE-DAWLEY**

Пьянков А.А., Морина И.Ю., Романова И.В.\*

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

\* irinaromanova@mail.ru

У самцов половозрелых крыс Sprague-Dawley была проведена операция нефрэктомии (модель 5/6) для моделирования сердечно-сосудистой недостаточности. С помощью Вестерн-блоттинга в сосудистом сплетении третьего желудочка был проведен анализ белков клаудина-1 и клаудина-2. Полученные данные демонстрируют статистически достоверные уменьшения уровня обоих типов белков у нефрэктомированных крыс по сравнению с ложнооперированными. Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие хронической почечной недостаточности и сердечно-сосудистой патологии сопровождаются нарушением гемато-ликровного барьера, что, очевидно, приводит к нарушению функций ЦНС.

**Ключевые слова:** мозг, сосудистое сплетение, гематоликворный барьер, сердечно-сосудистая недостаточность



# ANALYSIS OF BARRIER PROPERTIES OF THE CHOROID PLEXUS OF THE THIRD BRAIN VENTRICLE IN MODELING CARDIOVASCULAR PATHOLOGY IN SPRAGUE-DAWLEY RAT

Piankov A.A., Morina I.Y., Romanova I.V.\*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

\* irinaromanova@mail.ru

In adult male Sprague-Dawley rats, nephrectomy (5/6 model) was performed to model cardiovascular failure. Using Western blotting, claudin-1 and claudin-2 proteins were analyzed in the choroid plexus of the third ventricle. The data obtained demonstrate statistically significant decreases in the level of both types of proteins in nephrectomized rats vs. to sham-operated. The data obtained indicate that the development of chronic renal failure and cardiovascular pathology are accompanied by a violation of the hemato-lymphatic barrier, which obviously leads to a violation of the central nervous system functions.

**Keywords:** brain, choroid plexus, blood-cerebrospinal fluid barrier, cardiovascular failure

## Актуальность

Развитие патологий сердечно-сосудистой системы в современном обществе являются огромной проблемой медицины. Поэтому исследование механизмов их развития является актуальной задачей физиологии. В связи с этим моделирование сердечно-сосудистой недостаточности у животных чрезвычайно важная задача для разработки фармакологических стратегий коррекции заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Нефрэктомия у крыс Sprague-Dawley – широко используемый экспериментальный подход, при котором удаление почки приводит к хронической почечной недостаточности и развитию сердечно-сосудистых осложнений, которые развиваются на фоне развития фиброза в сосудах и сердце [1, 2].

В многочисленных исследованиях при моделировании сердечно-сосудистой патологии в основном рассматриваются изменения в сосудах и сердце, однако вопрос об изменении центральных механизмов при этом мало изучен.

Сосудистые сплетения (choroid plexus), локализованные в желудочках мозга, являются эпителиальными образованиями, которые участвуют в образовании ликвора, а также в парацеллюлярном транспорте различных веществ из сосудистой оболочки, а также выведении метаболитов мозга и продуктов метаболизма в кровь. В третьем желудочке мозга сосудистое сплетение прилегает к его крыше и образует многочисленные складки. Показано, что плотные контакты между клетками сосудистого сплетения могут быть образованы различными белками, которые ответственны за

парацеллюлярный транспорт. В частности, клаудин-1 и клаудин-2 – белки плотных контактов, которые экспрессируются клетками сосудистых сплетений желудочков мозга [3, 4]. Если клаудин-1 относится к типу уплотняющих белков, то клаудин-2 – парообразующий белок, который, в частности, формирует парацеллюлярные каналы для воды. Изменение экспрессии клаудинов выявлено при различных патологиях, в частности при инсульте и рассеянном склерозе [5, 6].

Цель настоящего исследования – оценить уровень экспрессии белков клаудин-1 и клаудин-2 в сосудистом сплетении на фоне развития сосудистой патологии при моделировании хронической почечной недостаточности у крыс.

### **Материалы и методы**

Эксперименты проведены на половозрелых самцах крысы линии Sprague-Dawley (масса 250-300 г), которые находились в стандартных условиях вивария при свободном доступе к гранулированному корму и воде. Операция нефрэктомии (5/6) и характеристика животных ранее были подробно описаны [1, 2]. В настоящем исследовании использован мозг ложнооперированных (ЛО, n = 6) и нефрэктомированных (НЭ, n = 6) крыс, который был заморожен при  $-80^{\circ}\text{C}$ . При  $-20^{\circ}\text{C}$  (в криостате) из мозга была вырезана ткань области вокруг крыши 3-го желудочка мозга из которой были приготовлены пробы для анализа уровня белка методом Вестерн-блоттинга, этапы проведения которого ранее были подробно описан [7]. После электрофореза в 13% бис-акриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham), промывали в TRIS-буфере с 0.1% Tween-20 (pH 7.6), блокировали в блокирующем буфере (Bio-Rad). Инкубацию мембран проводили в течение 16–18 ч ( $4^{\circ}\text{C}$ ) при покачивании в первичных антителах кролика к клаудину-1 (Cell Signaling; Mr = 20 кД, 1:500) или кролика к клаудину-2 (Invitrogen; Mr = 25 кД, 1:500). Также для инкубации использовали вторичные IgG козы против кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma; 1:10000). В качестве контрольного белка был использован GAPDH для определения которого были использованы первичные антитела мыши к GAPDH (Affinity Biosciences Inc.; 1:6000; Mr = 34 кДа) и вторичные IgG козы против мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, 1:10000). Для визуализации хемифлуоресцентного сигнала использовали реагент ECL, визуализацию сигнала проводили с помощью оборудования ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 10.2. Нормальность распределения проверяли критерием Шапиро-Уилка. Сравнение двух групп проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Данные представляли, как  $M \pm SEM$ , различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

Результаты Вестерн-блоттинга свидетельствуют об уменьшении в сосудистом сплетении третьего желудочка мозга уровня белков клаудина-1 и клаудина-2 у нефрэктомированных крыс по сравнению с ложнооперированными (Рис. 1), что подтверждается результатами статистического анализа (Рис. 2).

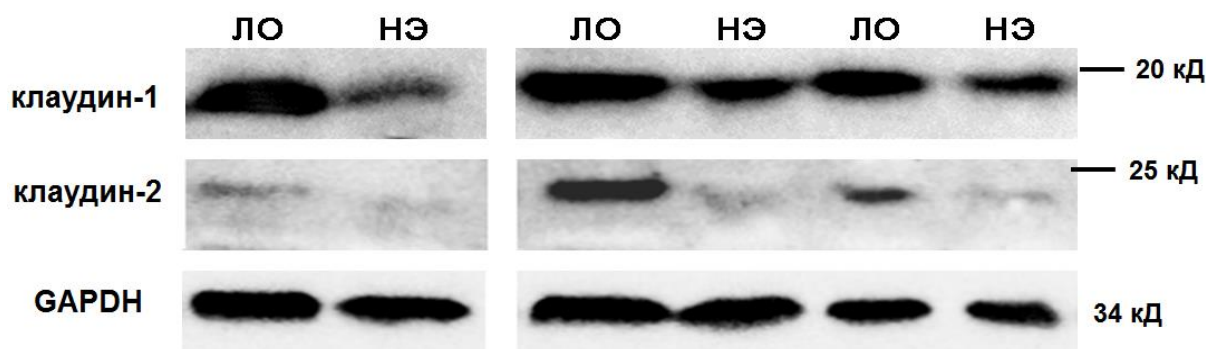


Рис. 1. Результаты Вестерн-блоттинга демонстрирует уровень белков клаудина-1 и клаудина-2 в сосудистом сплетении третьего желудочка мозга у ложнооперированных (ЛО) и нефрэктомированных (НЭ) крыс. GAPDH – контрольный белок

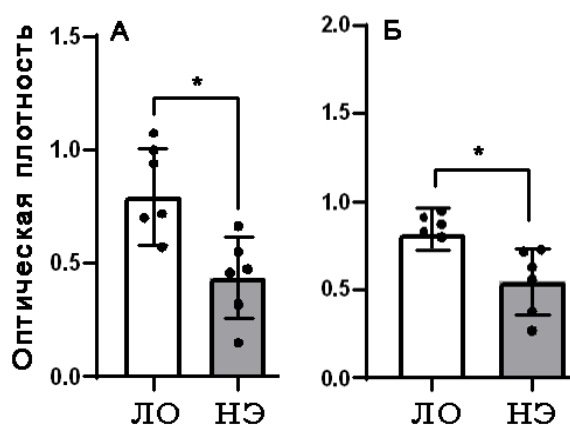


Рис. 2. Статистический анализ результатов Вестерн-блоттинга клаудина-1 (А) и клаудина-2 (Б) в сосудистом сплетении третьего желудочка мозга у ложнооперированных (ЛО,  $n = 6$ ) и нефрэктомированных (НЭ,  $n = 6$ ) крыс. \* – достоверное отличие ( $p < 0.05$ ), U-критерий Манна-Уитни. Оптическая плотность представлена в условных единицах

Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие хронической почечной недостаточности и сердечно-сосудистой патологии

сопровождается нарушением гемато-ликровного барьера, что, очевидно, приводит к нарушению функций ЦНС.

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

Все эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 2/5-2023), European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### **Список литературы**

1. Agalakova N.I., Mikhailova E.V., Piankov A.A., Nadei O.V., Ershov I.A., Galagudza M.V., Bagrov A.Y., Romanova I.V. Expression of Pro-Fibrotic Factors in Cardiac Tissue of Wistar and Sprague–Dawley Rats during the Development of Chronic Kidney Disease // *J Evol. Biochem. Physiol.* 2023. Vol. 59. № 3. Pp. 941-950.

2. Agalakova N.I., Mikhailova E.V., Ershov I.A., Nadei O.V., Pyankov A.A., Galagoudza M.M., Adair C.D., Romanova I.V., Bagrov A.Y. Antibody to endogenous cardiotonic steroid reverses vascular fibrosis and restores vasorelaxation in chronic kidney disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Vol. 25. № 16. At. 8896.

3. Kratzer I., Vasiljevic A., Rey C., Fevre-Montange M., Saunders N., Strazielle N., Ghersi-Egea J.F. Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier // *Histochem Cell Biol.* 2012. Vol. 138. № 6. Pp. 861–879.

4. Venugopal S., Anwer S., Szász K. Claudin-2: Roles beyond Permeability Functions // *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20. № 22. At. 5655.

5. Sladojevic N., Stamatovic S.M., Johnson A.M., Choi J., Hu A., Dithmer S., Blasig I.E., Keep R.F., Andjelkovic A.V. Claudin-1-Dependent Destabilization of the Blood-Brain Barrier in Chronic Stroke // *J Neurosci.* 2019. Vol. 39. № 4. Pp. 743–757.

6. Zhang L., Tang S., Ma Y., Liu J., Monnier P., Li H., Zhang R., Yu G., Zhang M., Li Y., Feng J., Qin X. RGMa Participates in the Blood-Brain Barrier Dysfunction Through BMP/BMPR/YAP Signaling in Multiple Sclerosis // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. At. 861486.

7. Mikhrina A.L., Saveleva L.O., Alekseeva O.S., Romanova I.V. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2020. V. 50, №. 3. Pp. 367–373.

© Пьянков А.А., Моруна И.Ю., Романова И.В., 2024

**ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА НА ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЕ, ГИПОФИЗАРНЫЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ ЗВЕНЬЯ ТИРЕОИДНОЙ ОСИ У САМЦОВ КРЫС, В ТОМ ЧИСЛЕ СТИМУЛИРОВАННЫХ ТИРОЛИБЕРИНОМ**

Романова И.В. \*, Деркач К.В., Морина И.Ю., Шпаков А.О.

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

\* irinaromanova@mail.ru

Гиперактивация рецептора тиреотропного гормона (ТТГ) вследствие активирующих мутаций или при воздействии стимулирующих аутоантител, выработанных на рецептор ТТГ, приводит к раку щитовидной железы (ЩЖ), аутоиммунному гипертиреозу (болезни Грейвса) и его тяжелому осложнению – офтальмопатии Грейвса. В связи с этим разработка новых подходов для коррекции активности рецептора ТТГ является одной из актуальных проблем современной молекулярной эндокринологии и фармакологии. Наибольший интерес здесь представляют низкомолекулярные аллостерические антагонисты рецептора ТТГ, в том числе разработанные нами на основе структуры тиено[2,3-d]-пиримидина соединения ТРУ1 и ТРУ5. Однако эффекты таких антагонистов на гипоталамические и гипофизарные звенья тиреоидной оси, а также на морфологию ЩЖ до сих пор не были изучены. В соответствии с этим, цель работы было изучить влияние однократного введения ТРУ1 и ТРУ5 с активностью антагонистов рецептора ТТГ на уровень ТТГ в крови и на экспрессию гипоталамических генов, в том числе в условиях стимулирующего воздействия тиролиберина (TRH), у самцов крыс, а также оценить морфологию ЩЖ у животных при пятидневном введении ТРУ1. Оба соединения подавляли TRH-стимулированную продукцию тиреоидных гормонов и экспрессию генов, ответственных за их синтез в ЩЖ, но практически не влияли на уровень ТТГ и на экспрессию гипоталамических генов, вовлеченных в регуляцию активности тиреоидной системы, за исключением слабо выраженного стимулирующего эффекта ТРУ1 на экспрессию  $\beta$ -изоформы рецептора тиреоидных гормонов. При пятидневном введении ТРУ1 лишь в небольшой степени влиял на морфологию ткани ЩЖ, вызывая начальные, слабо выраженные признаки очаговой патологии в периферических областях ЩЖ при сохранении ее функциональной активности. Таким образом, эффекты ТРУ1 и ТРУ5, аллостерических антагонистов рецептора ТТГ, реализуются путем предотвращения гормональной стимуляции рецептора ТТГ в тироцитах и слабо влияют на ультраструктуру ткани ЩЖ.

**Ключевые слова:** рецептор тиреотропного гормона, низкомолекулярный антагонист, гипоталамус, щитовидная железа, тиреоидный гормон

**THE INFLUENCE OF THYROID-STIMULATING HORMONE RECEPTOR ANTAGONISTS ON THE HYPOTHALAMIC, PITUITARY AND PERIPHERAL PARTS OF THE THYROID AXIS IN MALE RATS, INCLUDING THOSE STIMULATED WITH THYROTROPIN-RELEASING HORMONE**

Romanova I.V. \*, Derkach K.V., Morina I.Y., Shpakov A.O.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

\* irinaromanova@mail.ru

Hyperactivation of the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor due to activating mutations or exposure to stimulating autoantibodies produced against the TSH receptor leads to thyroid cancer, autoimmune hyperthyroidism (Graves' disease) and its severe complication, Graves' ophthalmopathy. In this regard, the development of new approaches to correct the activity of the TSH receptor is one of the pressing problems of modern molecular endocrinology and pharmacology. Of greatest interest here are low-molecular allosteric antagonists of the TSH receptor, including the compounds TPY1 and TPY5, which we developed based on the structure of thieno[2,3-d]-pyrimidine. However, the effects of such antagonists on the hypothalamic and pituitary parts of the thyroid axis, as well as on the morphology of the thyroid gland, have not yet been studied. In accordance with this, the purpose of the work was to study the effect of a single administration of TPY1 and TPY5 with the activity of TSH receptor antagonists on the blood TSH level and on the expression of hypothalamic genes, including under conditions of stimulating action of thyroliberin (TRH), in male rats, and also to evaluate morphology of the thyroid in animals after five-day TPY1 administration. Both compounds suppressed TRH-stimulated production of thyroid hormones and the expression of genes responsible for their synthesis in the thyroid, but did not significantly affect the TSH level and the expression of hypothalamic genes involved in the regulation of the activity of the thyroid system, with the exception of a weakly expressed stimulatory effect of TPY1 on the expression of  $\beta$ -isoform of the thyroid hormone receptor. With a five-day administration, TPY1 only had a small effect on the morphology of thyroid tissue, causing initial, mild signs of focal pathology in the peripheral areas of the thyroid while maintaining its functional activity. Thus, the effects of TPY1 and TPY5, allosteric antagonists of the TSH receptor, are realized by preventing hormonal stimulation of the TSH receptor in thyrocytes and have little effect on the ultrastructure of thyroid tissue.

**Keywords:** thyroid-stimulating hormone receptor, low-molecular-weight antagonist, hypothalamus, thyroid gland, thyroid hormone

## Актуальность

Тиреоидная ось включает следующие основные компоненты: (1) гипоталамические нейроны, экспрессирующие и секретирующие трипептид тиролиберин (TRH), представляющий собой рилизинг-фактор для тиреотропного гормона (ТТГ), (2) локализованные в аденогипофизе тиретроциты, продуцирующие ТТГ в ответ на стимуляцию TRH, (3) тироциты щитовидной железы (ЩЖ), осуществляющие синтез тиреоидных гормонов – тироксина (Т4), генерируемого из молекулы тиреоглобулина после его йодирования, и эффекторного гормона тиреоидной оси трийодтиронина (Т3), образующегося в результате конверсии из Т4 с помощью D1- и D2-дейодиназ. Регуляторные связи в тиреоидной оси реализуются как по нисходящему пути – от гипоталамических нейронов к фолликулярным клеткам ЩЖ, так и по восходящему пути, где нижележащие гормоны, например, Т3, по механизму отрицательной обратной связи контролируют функциональную активность вышележащих звеньев тиреоидной оси. В настоящее время известно сравнительно мало фармакологических регуляторов тиреоидной оси, в том числе ее ключевого звена – рецептора ТТГ, локализованного в тироцитах и ответственного за синтез тиреоидных гормонов, регуляцию клеточного роста, апоптоза и дифференцировки этих клеток. Нарушение функционирования рецептора ТТГ, в том числе мутации в нем, приводящие к гиперактивации этого рецептора, а также выработка различных по профилю активности аутоантител к рецептору ТТГ вследствие запуска аутоиммунных процессов в ЩЖ являются первопричинами тиреоидной патологии [1]. Одними из наиболее распространенных заболеваний ЩЖ являются аутоиммунный гипертиреоз (болезнь Грейвса), вызываемый стимулирующими аутоантителами к рецептору ТТГ, а также карцинома ЩЖ, обусловленная активирующими мутациями в этом рецепторе. Следует отметить, что при болезни Грейвса стимулирующие аутоантитела вызывают также тяжелые формы офтальмопатии, воздействуя на орбитальные фибробласты. Для лечения рака ЩЖ обычно используют хирургические подходы и терапию радиоактивным йодом, в то время как при лечении болезни Грейвса также применяют фармакотерапию ингибиторами тиреоидных гормонов. Но все эти подходы имеют ряд серьезных осложнений и не всегда эффективны. Вследствие этого весьма актуальной представляется задача разработки ингибиторов рецептора ТТГ, что позволит уже на начальном этапе синтеза тиреоидных гормонов предотвратить их гиперпродукцию, а также подавить негативные эффекты стимулирующих аутоантител как на ЩЖ, так и на внетиреоидные ткани, включая орбитальные фибробласты. Одним из подходов для подавления базальной и стимулированной ТТГ или аутоантителами активности рецептора ТТГ является применение аллостерических антагонистов/инверсионных агонистов этого рецептора на основе низкомолекулярных гетероциклических соединений. Такие соединения ранее начали разрабатываться как нами, так и другими авторами [2–6].

Однако влияние этих соединений на экспрессию генов, кодирующих ключевые белки, вовлеченные в нисходящие и восходящие пути регуляции функционального состояния тиреоидной оси, а также морфологические особенности ткани ЩЖ исследованы не были. Вследствие этого, цель работы состояла в изучении влияния однократного введения разработанных нами соединений ТРУ1 и ТРУ5, производных тиено[2,3-d]-пиримидина, наделенных активностью антагонистов рецептора ТТГ, на уровень ТТГ в крови и экспрессию гипоталамических генов, в том числе при стимулирующем воздействии TRH, у самцов крыс, а также оценить влияние пятидневного введения животным ТРУ1 на морфологию ткани ЩЖ с целью оценки его возможного токсического эффекта.

### **Материалы и методы**

В опытах использовали самцов крыс линии Wistar, получавших гранулированный сухой корм и находящихся в стандартных условиях вивария.

Формировали следующие группы (в каждой по шесть животных): контроль (К), введение препаратов ТРУ1 или ТРУ5, введение TRH и введение ТРУ1 и ТРУ5 совместно с TRH. Соединения ТРУ1 и ТРУ5 вводили однократно, внутрибрюшинно, в дозе 20 мг/кг, в виде раствора в ДМСО. TRH («Sigma», США) растворяли в физиологическом растворе и вводили интраназально в дозе 300 мкг/кг, как описано нами ранее [7]. Также формировали две группы для оценки длительного воздействия ТРУ1 на ткани ЩЖ – контроль и группу с пятидневным введением ТРУ1 в суточной дозе 20 мг/кг (в/б). Контрольным крысам вместо препаратов вводили их растворители. Введение ТРУ1 и ТРУ5 осуществляли в 10:30, TRH – в 11:00. Первый забор крови осуществляли в 10:00 (до введения препаратов), второй забор – через 3 ч после введения TRH. Образцы крови получали из хвостовой вены, для чего использовали местный наркоз (2% лидокаин, 2 мг/кг). Для определения уровня свободного тироксина (fT4) и свободного трийодтиронина (fT3) использовали наборы фирмы «Иммунотех» (Россия). Для определения в крови концентрации ТТГ использовали набор фирмы «Cusabio Biotech Co., Ltd.» (КНР).

Количественную ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией осуществляли, как описано ранее [6], выделяя для этого ткани гипоталамуса. Для детекции сигнала использовали прибор 7500 Real-Time PCR System («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), в качестве референсных были взяты гены 18S-pPHK (18S rRNA) и  $\beta$ -актина (Actb). Полученные данные рассчитывали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$ , значения RQ рассчитывали по отношению к экспрессии гена в гипоталамусе контрольных крыс, принятой за 1.0 [8]. Для морфологического анализа ткани ЩЖ фиксировали в 15% пара-формальдегиде в фосфатном буфере (PBS, pH 7.4) в течение 3 дней. После промывки в PBS и криопротекции в 10% и затем в 30% растворе сахарозы, образцы замораживали в среде Tissue-Tek («Sacura, Finetek Europe», Голландия). Срезы толщиной 7 мкм были приготовлены



с использованием криостата Leica CM-1520 («Leica Microsystems», Германия). Каждый пятый срез монтировали на стеклах Super-Frost («Menzel», Германия), стекла высушивали в течение ночи, окрашивали гематоксилином и эозином и после промывки заключали под покровное стекло с помощью глицерина. Микрофотографии получали с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1 («Carl Zeiss», Германия), используя объектив x20.

Статистический анализ проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 26 («IBM», США). Нормальность распределения проверяли критерием Шапиро-Уилка. Все данные имели нормальное распределение, вследствие чего для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Апостериорный анализ проводили с помощью теста Тьюки. Данные представляли, как  $M \pm SEM$ , различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

### Результаты и обсуждение

После введения крысам соединений ТРУ1 и ТРУ5, хотя и с различной интенсивностью, отмечали снижение стимулированных TRH уровней тиреоидных гормонов, а также подавление в ткани ЩЖ стимулированной TRH экспрессии генов *Trp* и *Tg*, кодирующих тиреопероксидазу и тиреоглобулин, ключевые компоненты синтеза тиреоидных гормонов (табл. 1). Полученные данные указывают на присущую ТРУ1 и ТРУ5 активность антагонистов рецептора ТТГ. Препараты с таким профилем фармакологической активности востребованы как при карциноме ЩЖ, обусловленной конститутивно повышенной активностью рецептора ТТГ, так и при болезни Грейвса, вызванной наличием стимулирующих аутоантител к рецептору ТТГ, обладающих активностью полных агонистов [4].

Таблица 1.

Уровни тиреоидных гормонов и экспрессия генов *Trp* и *Tg* в ткани ЩЖ крыс с обработкой ТРУ1, ТРУ5, тиролиберином и совместно этими тиено[2,3-d]-пиримидиновыми производными и тиролиберином

Группа крыс	fT4, пмоль/л	fT3, пмоль/л	ТТГ, мкЕД/мл	Ген <i>Trp</i> , RQ (отн. ед.)	Ген <i>Tg</i> , RQ (отн. ед.)
К	26.2±3.0	2.4±0.2	0.64±0.11	1.01±0.06	1.00±0.11
TRH	41.5±3.5*	5.7±0.4*	1.79±0.28*	3.28±0.41*	2.33±0.17*
ТРУ1	22.2±2.0	2.0±0.2	0.76±0.15	0.83±0.12	1.12±0.16
ТРУ1+TRH	29.3±1.6#	3.6±0.4*#	1.80±0.34*	1.78±0.20*#	1.53±0.37
ТРУ5	20.7±1.8	1.8±0.1*	0.94±0.19	0.78±0.09	0.90±0.13
ТРУ5+TRH	28.4±1.9#	3.0±0.4#	2.02±0.38*	1.62±0.22#	1.42±0.14#

*Примечание.* Различия с группой К (\*) и между группами ТРУ1+TRH или ТРУ5+TRH и группой TRH (#) статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 6$ ,  $M \pm SEM$ .

На следующем этапе в гипоталамусе крыс исследовали влияние ТРУ1 и ТРУ5 на экспрессию гена *ProTRH*, кодирующего про-тиролиберин, высокомолекулярный предшественник молекул тиролиберина, генов *Tr-alpha* и *Tr-beta*, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -изоформы рецепторов тиреоидных гормонов, а также генов *Dio2* и *Dio3*, кодирующих D2- и D3-дейодиназы. D2-Дейодиназа осуществляет конверсию T4 в T3, в то время как D3-дейодиназа, напротив, ответственна за инактивацию обоих тиреоидных гормонов. Показано, что в группах с обработкой ТРУ1 и ТРУ5 существенных изменений в экспрессии изученных гипоталамических генов выявлено не было, за исключением повышения экспрессии гена *Tr-beta*, которое в группе ТРУ1 было статистически значимым (табл. 2). В группе с обработкой одним TRH была снижена экспрессия гена *ProTRH* и повышена экспрессия гена *Dio2*, что, как можно полагать, вызвано запуском обратных отрицательных связей в случае гена про-тиролиберина и повышением уровня тиреоидных гормонов, субстратов D2-дейодиназы (табл. 2). Показана также тенденция к повышению экспрессии D3-дейодиназы, но различия с контролем в этом случае не были статистически значимыми ( $p = 0.079$ ). В группах с совместным введением TRH и тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных показано повышение экспрессии генов D2-дейодиназы (но менее выраженное, чем при введении одного TRH), а экспрессия гена *ProTRH* восстанавливалась до контрольных значений. Тем самым, ТРУ1 и ТРУ5, ослабляя тиреоидогенный эффект TRH, смягчали или полностью блокировали его регуляторные эффекты на экспрессию генов *Dio2* и *ProTRH*. При этом значимого непосредственного влияния на экспрессию исследуемых гипоталамических генов оба тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных не оказывали, за исключением небольшого усиления экспрессии  $\beta$ -изоформы рецепторов тиреоидных гормонов, значимого в случае ТРУ1.

Оценка уровня ТТГ в крови животных показала, что в группах с обработкой TRH она была значимо повышена (табл. 1). Введение ТРУ1 и ТРУ5 не влияло на концентрацию ТТГ, как в группах без обработки TRH, так в группах с TRH-индуцированным повышением уровня этого гормона. Тем самым, можно заключить, что, по крайней мере, краткосрочно тиено[2,3-d]-пиримидиновые производные с активностью инверсионных агонистов рецептора ТТГ на секрецию ТТГ и его уровень в крови не влияют.

На заключительном этапе оценивали влияние пятидневной обработки крыс с помощью ТРУ1 на тиреоидный статус и морфологические особенности ЩЖ. Показано, что длительное введение ТРУ1 приводит к значимому снижению уровня тиреоидных гормонов, не влияя на уровень ТТГ. Результаты морфологического анализа показали, что в ЩЖ крыс, обработанных ТРУ1, имеются умеренно выраженная функциональная активность и начальные, слабо выраженные признаки очаговой патологии. Эта патология выявлялась в основном в периферических областях ЩЖ, что, как можно полагать, компенсируется образованием новых фолликулов в центральных ее областях (данные не представлены).

Таблица 2.

Экспрессия гипоталамических генов у крыс с обработкой ТРУ1, ТРУ5, тиролиберином и совместно этими тиено[2,3-d]-пиримидиновыми производными и тиролиберином

Группа крыс	Ген <i>ProTRH</i> , RQ (отн. ед.)	Ген <i>Tr-alpha</i> , RQ (отн. ед.)	Ген <i>Tr-beta</i> , RQ (отн. ед.)	Ген <i>Dio2</i> , RQ (отн. ед.)	Ген <i>Dio3</i> , RQ (отн. ед.)
К	1.03±0.07	1.02±0.13	1.02±0.09	1.04±0.04	1.03±0.17
TRH	0.34±0.10*	1.11±0.24	0.88±0.19	2.18±0.13*	1.65±0.14
ТРУ1	1.25±0.09	1.21±0.17	1.85±0.11*	0.98±0.04	0.76±0.12
ТРУ1+TRH	1.07±0.11#	0.87±0.20	1.22±0.17	1.74±0.12*	1.40±0.08
ТРУ5	1.08±0.13	1.19±0.08	1.68±0.21	1.10±0.14	0.77±0.15
ТРУ5+TRH	0.94±0.16	1.24±0.07	0.86±0.09	1.54±0.05*#	1.41±0.03

Примечание к таблице 2. Различия с группой К (\*) и между группами ТРУ1+TRH или ТРУ5+TRH и группой TRH (#) статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 6$ ,  $M \pm SEM$ .

Таким образом, нами впервые показано, что тиено[2,3-d]-пиримидиновые производные с активностью антагонистов рецептора ТТГ, которые снижают стимулированные TRH уровни тиреоидных гормонов и экспрессию ключевых генов, ответственных за синтез тиреоидных гормонов в ЩЖ, практически не влияют на уровень ТТГ в крови и на экспрессию гипоталамических генов, вовлеченных в регуляцию активности тиреоидной системы, за исключением слабо выраженного стимулирующего эффекта ТРУ1 на экспрессию  $\beta$ -изоформы рецепторов тиреоидных гормонов. Это указывает на то, что их эффекты реализуются почти исключительно путем предотвращения стимуляции рецептора ТТГ в тироцитах ЩЖ. Важно, что при пятидневном введении ТРУ1 он лишь в небольшой степени влиял на морфологию ткани ЩЖ, вызывая начальные, слабо выраженные признаки очаговой патологии в периферических областях ЩЖ при сохранении ее функциональной активности.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда (проект № 19-75-20122).

Все эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 2/5-2023), European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Scarpaticcio L., Trimboli P., Keller F., Imperiali M., Piccardo A., Giovanella L. Diagnostic testing for Graves' or non-Graves' hyperthyroidism: A comparison of two thyrotropin receptor antibody immunoassays with thyroid scintigraphy and ultrasonography // *Clinical endocrinology (Oxford)*. 2020. Vol. 92. No. 2. Pp. 169–178.
2. Neumann S., Eliseeva E., McCoy J.G, Napolitano G., Giuliani C., Monaco F., Huang W., Gershengorn M.C. A new small-molecule antagonist inhibits Graves' disease antibody activation of the TSH receptor // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011. Vol. 96. No. 2. Pp. 548–554.
3. Neumann S., Pope A., Geras-Raaka E., Raaka B.M., Bahn R.S., Gershengorn M.C. A drug-like antagonist inhibits thyrotropin receptor-mediated stimulation of cAMP production in Graves' orbital fibroblasts // *Thyroid*. 2012. Vol. 22. No. 8. Pp. 839–843.
4. Marcinkowski P., Kreuchwig A., Mendieta S., Hoyer I., Witte F., Furkert J., Rutz C., Lentz D., Krause G., Schüle R. Thyrotropin Receptor: Allosteric Modulators Illuminate Intramolecular Signaling Mechanisms at the Interface of Ecto- and Transmembrane Domain // *Molecular Pharmacology*. 2019. Vol. 96. No. 4. Pp. 452–462.
5. Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Sorokoumov V.N., Shpakov A.O. New Thieno-[2,3-d] pyrimidine-Based Functional Antagonist for the Receptor of Thyroid Stimulating Hormone // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2020. Vol. 491. No. 1. Pp. 77–80.
6. Derkach K.V., Fokina E.A., Bakhtyukov A.A., Sorokoumov V.N., Steepochkina A.M., Zakharova I.O., Shpakov A.O. The Study of Biological Activity of a New Thieno [2,3-D]-Pyrimidine-Based Neutral Antagonist of Thyrotropin Receptor // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022. Vol. 172. No. 6. Pp. 713–717.
7. Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., Shpakov A.O. The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats // *Hormone and Metabolic Research*. 2015. Vol. 47. No. 12. Pp. 916–924.
8. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method // *Nature Protocols*. 2008. Vol. 3. No. 6. Pp. 1101–1108.

© Романова И.В., Деркач К.В., Морина И.Ю., Шпаков А.О., 2024

## **ВЛИЯНИЕ БАЗОЛАТЕРАЛЬНОГО ЯДРА МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА НА ФОРМИРОВАНИЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ КРЫС**

Самсонова Е.А. \*, Романова И.Д.

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королёва, г. Самара, Россия

\* liza\_sams@mail.ru

Базолатеральное ядро миндалевидного комплекса играет важную роль в регуляции эмоций, тревожности и стресса, а также участвует в процессах памяти и обучения. Понимание того, как данная структура вовлечена в механизмы формирования зависимости, является важным шагом для разработки более точных и эффективных терапевтических вмешательств.

В ходе исследования рассматривались показатели исследовательской и двигательной активности, а также уровень тревожности алкоголизованных самцов крыс с амигдалэктомией и без при полунасильственной алкоголизации 5%-ным раствором этанола, предоставлении выбора между раствором и питьевой водой, и полной отменой алкоголя.

**Ключевые слова:** базолатеральное ядро; миндалевидный комплекс; алкогольная зависимость

## **INFLUENCE OF THE BASOLATERAL AMYGDALA ON THE FORMATION OF ALCOHOL ADDICTION IN RATS**

Samsonova E.A. \*, Romanova I.D.

Samara University, Samara, Russia

\* liza\_sams@mail.ru

The basolateral amygdala plays an important role in the regulation of emotions, anxiety and stress, and is also involved in memory and learning processes. Understanding how this structure is involved in the mechanisms of addiction is an important step for developing more precise and effective therapeutic interventions.

The study examined indicators of exploratory and motor activity, as well as the level of anxiety of dependent male rats with and without amygdalotomy during semi-forced alcoholization with a 5% ethanol solution, giving a choice between the solution and drinking water, and complete abolition of alcohol.

**Keywords:** basolateral amygdala, amygdala, alcohol addiction

### **Актуальность**

Алкогольная зависимость – это хронически рецидивирующее расстройство, характеризующееся навязчивым поиском и приемом алкоголя, потерей контроля над ограничением его приема и возникновением

абстинентного синдрома при отсутствии вещества. Ранее известные данные говорят о том, что большую роль в возникновении зависимостей играет именно базолатеральное ядро миндалины [1].

Цель работы: оценить роль правого базолатерального отдела миндалевидного комплекса в формировании алкогольной зависимости у крыс пубертатного возраста.

#### **Материалы и методы**

Исследование проводилось на 6 самцах крыс подросткового возраста (2 месяца). Масса тела животных варьировала в диапазоне от 120 до 140 г. Грызуны были помещены в условия неограниченного доступа к пище и жидкости. Контрольную группу крыс содержали в общей клетке на протяжении всего исследования, экспериментальную – в одиночных клетках сразу после операции на время восстановления, затем в общей клетке для оперированных крыс [2].

Эксперимент заключался в проведении под эфирным наркозом у животных экспериментальной группы правосторонней базолатеральной амигдалэктомии электролитическим методом (анодный ток 0,1 А в течение 10 секунд) в соответствии с координатами атласа мозга крыс (Р – 2.67 мм, L – 4.2 мм, V – 8.2 мм) [3, 4]. Крысам контрольной группы амигдалэктомию не делали. Затем животным обеих групп проводили полунасильственную алкоголизацию 5% раствором этанола в течение 2 недель. После появления зависимости осуществляли тестирование в установках «темно-светлая камера» и «крестообразный приподнятый лабиринт», отмечали следующие показатели поведенческой активности: выходы в открытые рукава (исследовательская деятельность), длительность пребывания в открытых рукавах и время в светлом отсеке (уровень тревожности), заглядывание вниз открытых рукавов (оценка риска). После этого и контрольным и экспериментальным крысам предоставляли выбор между 5% раствором этанола и водой в течение 7 дней, снова фиксировались показатели поведенческой активности в тех же установках, затем алкоголь полностью выводили из эксперимента, и, таким образом, вода была единственным источником жидкости, через 1 неделю вновь отмечали особенности поведения крыс обеих групп.

#### **Результаты и обсуждение**

Анализ полученных данных позволил определить отличия в поведенческих показателях экспериментальной и контрольной групп.

В ходе проведенных исследований было выявлено значительное влияние разрушения базолатерального ядра на формирование алкогольной зависимости. Исследовательская активность у самцов крыс с разрушенным правым базолатеральным ядром миндалевидного комплекса оказалась снижена по сравнению с животными контрольной группы. Это подтверждается результатами тестовых наблюдений за поведением животных в установках «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Тёмно-светлая камера».

В частности, исследование, проведённое в установке «Тёмно-светлая камера» показало, что амигдалэктомированные самцы меньше времени проводили в темной части установки, особенно в период алкоголизации, что может говорить о повышенном уровне исследовательской деятельности по сравнению с контрольной группой (Рис. 1.).

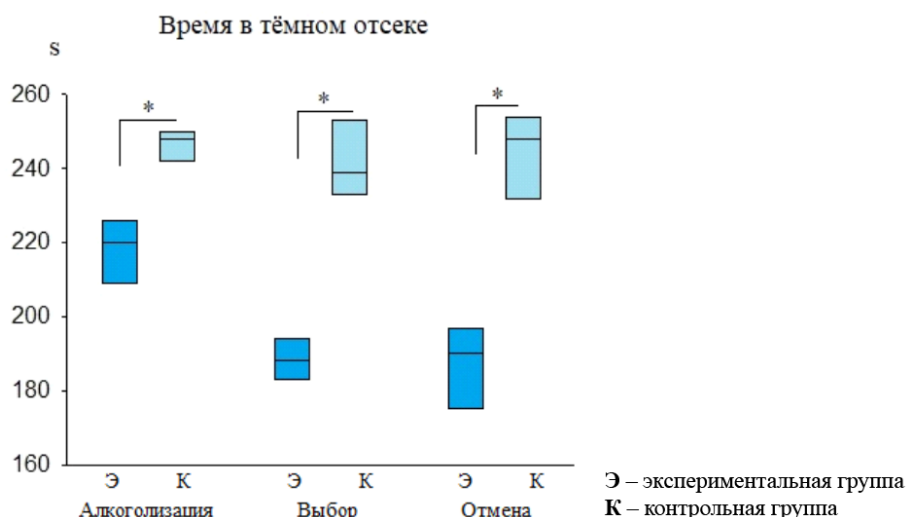


Рис. 1. Особенности поведения самок крыс с амигдалэктомией и без (опыт и контроль) в тестовой установке «Тёмно-светлая камера» \* –  $p < 0,05$

В установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» животные экспериментальной группы чаще выходили в открытые рукава лабиринта (Рис. 2.) и проводили в них намного больше времени (Рис. 3.), чем контрольные. Это подтверждает повышенный уровень исследовательской и двигательной активности, а также высокую степень оценки риска (Рис. 4.) у оперированных самцов.

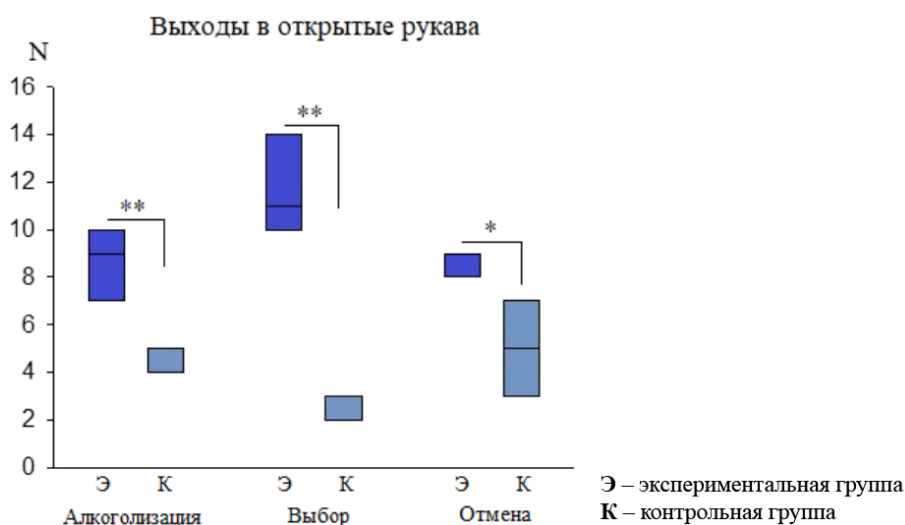


Рис. 2. Показатель исследовательской активности: выходы в открытые рукава в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт». \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

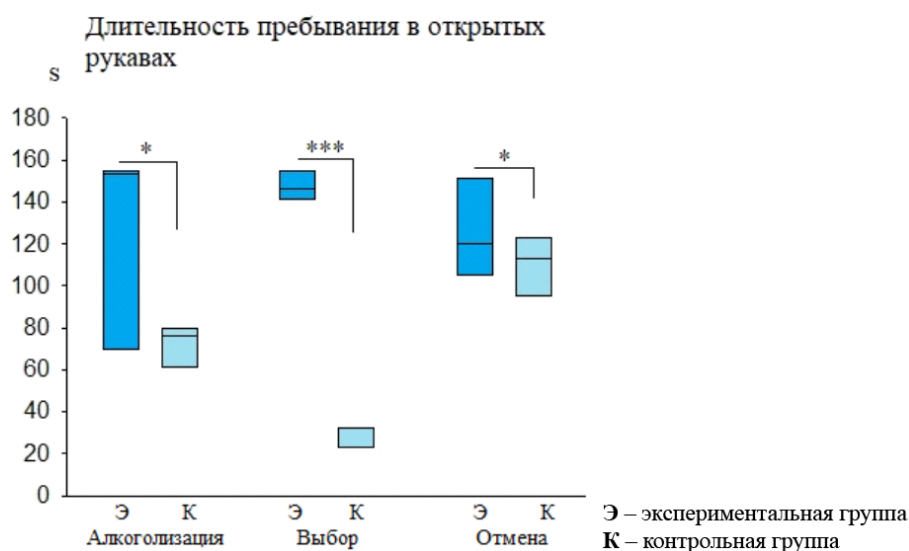


Рис. 3. Показатель тревожности: длительность пребывания в открытых рукавах в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт»  
\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$



Рис. 4. Показатель оценки риска: заглядывание вниз открытых рукавов в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт»  
\* –  $p < 0,05$

Полученные результаты отчетливо демонстрируют, что крысы с амигдалэктомией при алкоголизации показывают более выраженный показатель риска, такой как: заглядывание вниз открытых рукавов лабиринта. Данный факт свидетельствует о пониженной тревожности, в то время, как у неоперированных животных наблюдали низкий уровень



исследовательской и двигательной активности, а также высокий уровень беспокойства.

В ситуации предоставления выбора между 5% раствором этанола и водой, экспериментальные крысы отдавали большее предпочтение раствору этанола, по сравнению с контрольной группой, что подтверждает важную роль этого ядра в развитии зависимости. После отмены алкоголя у крыс с разрушенным ядром не наблюдаются выраженные изменения в поведении, тогда как у контрольной группы показатели поведенческой активности значительно изменились, что указывает на сильную зависимость и абстинентный синдром.

Таким образом, на основании наших исследований можно заключить, что базолатеральное ядро миндалевидного комплекса играет значительную роль в формировании алкогольной зависимости. Мы наблюдали изменение поведения зависимых самцов крыс экспериментальной группы, которое заключалось в снижении тревожности, и повышении двигательной и исследовательской активности, тогда как контрольные крысы демонстрировали относительно стабильные результаты.

### **Список литературы**

1. Ахмадеев А.В., Л.Б. Калимуллина. Миндалевидный комплекс мозга в механизмах алкогольной зависимости // Успехи физиологических наук. 2016. Т. 47. № 2. С. 28–34.
2. Лабораторные крысы: содержание, разведение, кормление и использование в биомедицинских исследованиях: учебное пособие / сост. В.И. Беляков, Е.М. Инюшкина. Самара: СамГУ, 2008, 40 с.
3. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: пер. с англ. Е.Н. Живописцевой / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон; под ред. А.С. Батуева. – М: Высш. шк., 1991, 399 с.
4. Paxinos, G. and Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates // Academic Press, San Diego, 1998.

© Самсонова Е.А., Романова И.Д., 2024

**ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ ВЛИЯЕТ НА СТРУКТУРНУЮ И УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА В ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС**

Туманова Н.Л., Васильев Д.С.\* , Дубровская Н.М.

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

\* dvasilyev@bk.ru

Результаты исследования с использованием классического светооптического метода Гольджи и электронной микроскопии обнаружили деструктивные изменения в гиппокампе крыс, вызванные нарушением эмбрионального развития (пренатальная гипергомоцистеинемия – пГГЦ): клеточная дегенерация, разрушение миелиновой оболочки аксонов, дегенерация в осевых цилиндрах дендритов и особенно, в варикозных расширениях дендритов. При пГГЦ в раннем эмбриогенезе происходит сбой в основном принципе организации области CA1 дорсального гиппокампа и в проводимости полимодальных сигналов. В связи с этим, нарушается пластичность дорсального гиппокампа и следовательно, поведение крыс в онтогенезе. Показано, что в тесте предпочтения одорантов у пГГЦ крыс, в отличие от контроля исчезало предпочтение феромонального миметика (изовалериановая кислота) перед биологически-индифферентными запахами. Полученные факты позволяют судить о дорсальном гиппокампе (особенно области CA1) как о сложном гетероморфном образовании, которое может служить морфологическим субстратом для интеграции поступающих в него разномодальных импульсов.

**Ключевые слова:** гиппокамп, цитоархитектоника, крыса, гипергомоцистеинемия, онтогенез, ультраструктурная организация

**PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA AFFECTS THE STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF THE DORSAL HIPPOCAMPUS IN THE ONTOGENY OF RATS**

Tumanova N.L., Vasiliev D.S.\* , Dubrovskaya N.M.

I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

\* dvasilyev@bk.ru

The results of the study using the classical Golgi light-optical method and electron microscopy revealed destructive changes in the rat hippocampus caused by impaired embryonic development (prenatal hyperhomocysteinemia - pHHC): cellular degeneration, destruction of myelin sheath of axons, degeneration in axial cylinders of dendrites and especially in varicosities. In pHHC, there is a failure in the basic principle of organization of the CA1 region and in the conduction of polymodal signals during early embryogenesis. Consequently, the plasticity of the

dorsal hippocampus and the behavior of rats in ontogeny are impaired. It was shown that in the test of odorant preference in pHHC rats, in contrast to the control, the preference of pheromonal mimetic (isovalerian acid) over biologically-indifferent odors disappeared. These findings suggest that the dorsal hippocampus (especially the CA1 region) is a complex heteromorphic formation that can serve as a morphological substrate for the integration of multimodal impulses entering it.

**Keywords:** hippocampus, cytoarchitectonics, rat, hyperhomocysteinemia, ontogenesis, ultrastructural organization

### **Актуальность**

Обоняние является уникальным среди сенсорных систем своей относительной структурной консервативностью на протяжении всей эволюции млекопитающих, поскольку было показано, что первичная обонятельная кора человека, включая переднее обонятельное ядро, обонятельный бугорок и грушевидную кору, имеет более сильную функциональную связь с сетями гиппокампа в состоянии покоя по сравнению с другими сенсорными системами [1]. Это свидетельствует о том, что, в отличие от других сенсорных систем, связь между обонянием и гиппокампом могла сохраниться в ходе эволюции млекопитающих, поскольку обонятельная система у животных имеет решающее значение для непосредственного выживания. Кроме того, она также влияет на социальные взаимодействия, репродуктивную функцию и многие другие аспекты поведения. Исходя из изложенного выше, в данной работе представлялось важным, в сравнении с контролем, выявить последствия воздействия пренатальной гипергомоцистеинемии (пГГЦ) на структурно-функциональные особенности нейронных сетей области CA1 дорсального гиппокампа и на поведение, связанное с обонянием, у крыс линии Вистар.

### **Материалы и методы**

При проведении работ был использован разработанный ранее метод дозированной метиониновой нагрузки, создаваемой путем принудительного перорального введения беременным самкам 0,15%-го водного раствора L-метионина (0,10-0,15 г в расчете на животное,) ежедневно, начиная с четвертого дня после оплодотворения и до родоразрешения. Таким образом добивались нарушения реакций аминокислотного обмена, в результате чего происходило накопление промежуточного продукта – аминокислоты гомоцистеина, в тканях матери и эмбрионов. Размер выборки потомства нормальных крыс и самок, перенесших ГГЦ, составлял по 10 животных.

Исследование особенностей структурной организации области CA1 дорсального гиппокампа взрослых (P90) контрольных крыс, а также направления и характера ветвления дендритных отростков проводили хромосеребряным методом Гольджи [2].

На P90 проводили ультраструктурный анализ нервной ткани мозга у контрольных и экспериментальных крыс (по 2 животных в каждой

группе). Для изучения межклеточных отношений, структуры нейропиля и особенностей синаптических контактов в областях CA1 дорсального гиппокампа крыс, после транскардиальной перфузии смесью 1% глютарового альдегида и 1% формальдегида на 0,1М PBS pH 7,4, область мозга дофиксировали 1% OsO<sub>4</sub>, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в эпон по стандартному протоколу (Белехова и др. 1995). На ультратоме LKB-III (LKB, Швеция) изготавливали ультратонкие срезы, толщиной 500 А, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit (FEI, США).

Взрослым трехмесячным животным из контрольной (n = 15) и пГГЦ (n = 15) групп в течение 8 дней ежедневно предъявляли образцы запахов. Крысу сажали в центр камеры и в течение 15 мин регистрировали количество подходов к каждой открытой стеклянной ёмкости с каплей, одного из восьми эфирных масел на дне. В эксперименте были использованы натуральные эфирные масла (гвоздики, мяты, эвкалипта, полыни, лаванды и валерианы). Из всего набора запахов только валериана обладала функционально значимым феромональным эффектом, универсальным для разных видов млекопитающих.

### **Результаты и обсуждение**

Методом световой микроскопии (хромосеребряный метод Гольджи) у контрольных крыс на P90 в гиппокампе были исследованы три зоны: центральная клеточная, зона базальных дендритов и зона апикальных дендритов, которые отличаются друг от друга по citoархитектонике, направлению и характеру ветвления дендритных отростков, а также по ходу аксонов. В центре CA1 дорсального гиппокампа контрольных животных расположен слой *stratum pyramidale*, представленный крупными пирамидными нейронами, от тел которых отходят многочисленные, тонкие, длинные базальные дендриты, со вторичными и третичными ответвлениями, с многочисленными шипиками на их поверхности. Мощные апикальные дендриты с многочисленными ответвлениями направлены от тел пирамидных нейронов вентрально в слой *stratum radiatum*, куда направлены коллатерали Шаффера. Их поверхность густо усеяна многочисленными дендритными шипиками и варикозными расширениями, богатыми синаптическими контактами (по данным электронной микроскопии).

Используя метод электронной микроскопии в гиппокампе были обнаружены деструктивные изменения в дендритных отростках центральных пирамидных нейронов у пГГЦ крыс по сравнению с контролем. В цитоплазме осевого цилиндра многих дендритов и аксонов появляется большое количество цистерн, полностью разрушаются кристы митохондрий, тургор осевого цилиндра дендрита уменьшается, а его оболочка становится извитой. В многочисленных варикозных расширениях, богатых синаптическими контактами, и располагающихся на дистальных участках дендритов также отмечены крупные цистерны в цитоплазме. В миелинизированных волокнах обнаружены значительное расслоение

миелиновой оболочки в виде выпуклых карманов с закрученными ламеллами. Деструктивные изменения структуры и ультраструктуры базальных и апикальных волокон свидетельствуют о нарушении связей гиппокампа с другими отделами мозга крысы. Проведённое исследование поведения пГГЦ животных, по сравнению с контролем, подтвердило эту версию.

Мы проанализировали активность животных в отношении исследования ёмкостей с одорантами и обнаружили следующее. Крысы, перенесшие пГГЦ, активнее интересовались запахами, поскольку среднее число подходов к ёмкостям с эфирными маслами у пГГЦ крыс было выше, чем у контрольных животных. Наибольшее предпочтение животные в контрольной группе оказывают маслу валерианы. Реже всего контрольные крысы подходили к ёмкости с маслом полыни. Обнаружено достоверное различие в количестве обследований ёмкости с одорантами полыни и валерианы. Внимание к запаху валерианы для пГГЦ крыс находилось на уровне остальных четырех одорантов – гвоздики, мяты, эвкалипта и лаванды. Поскольку считается, что масло валерианы обладает феромональными свойствами и является в норме физиологически значимым стимулом, можно сделать вывод о негативном влиянии пГГЦ на работу обонятельного анализатора [4].

Таким образом, наблюдавшиеся нами признаки нейродегенеративных изменений в проводящих путях: расслоение миелиновой оболочки аксонов, существенные изменения в базальных и апикальных дендритах, сужение их аксоплазмы, разрушение митохондрий, сильная вакуолизация в варикозных расширениях и в дендритах, в местах отхождения шипиков, свидетельствуют о комплексном нарушении в организации нейронных сетей в области СА1 дорсального гиппокампа крыс в раннем онтогенезе, с сопутствующим изменением поведения крыс.

Согласно представлениям М.Г. Белеховой об особенностях организации и строения (citoархитектоники) отделов мозга низших позвоночных животных, истоки гетеросенсорной конвергенции основаны на филогенетически древних механизмах афферентации посредством нейропилейных структур мозга у низших позвоночных. В нашем случае речь идёт о варикозных расширениях, наблюдающихся нами на дистальных отрезках аксонов и дендритов. Прогрессивная специализация сенсорных центров в эволюции позвоночных происходило путём преобразования этих нейропилейных структур [2]. Действие пГГЦ затрагивает структурную организацию нейропиля гиппокампа грызунов, нивелируя функциональные преимущества его прогрессивного строения. Этим может объясняться специфическое влияние пГГЦ на высшие интегративные функции, основанные на взаимосвязях между различными отделами конечного мозга. Возможно, этим объясняется повышенная чувствительность сенсорных систем и когнитивных функций, требующих интеграции сенсорной информации. Нарушение этих функций наблюдается при развитии различных нейродегенеративных процессов как в случае старения (развитие

нейродегенеративных заболеваний [5]), так и у потомства при различных осложнениях беременности [6] (в нашем случае – пренатальное действие гомоцистеина). Полученные факты позволяют судить о дорсальном гиппокампе (особенно области CA1) как о сложном гетероморфном образовании, которое может служить морфологическим субстратом для интеграции поступающих в него разномодальных импульсов.

Исследования выполнены в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

Все эксперименты проводились на крысах в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Zhou G., Olofsson J.K., Koubeissi M.Z., Menelaou G., Rosenow J., Schuele S.U., Xug P., Voss J.L., Lane G., Zelano C. Human hippocampal connectivity is stronger in olfaction than other sensory systems. *Progress in Neurobiology*. 2021. Vol. 201. P. 102027.
2. Белехова М.Г., Туманова Н.Л. 1988. Структурные основы слухосоматического взаимодействия в мозгу черепахи *Emys orbicularis*. Дендритный обмен между ядрами. *Журнал эвол. биохим. и физиол.* Т. 24. № 3. С. 326.
3. Белехова М.Г., Озирская Е.В., Чхеидзе Д.Д., Туманова Н.Л. 1995. Амигдалофугальная иннервация обонятельных луковиц амфибионтных черепах. *Журнал эвол. биохим. и физиол.* Т. 31. № 1. С. 64.
4. Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н. 2012. Влияние предварительного воздействия паров изовалериановой кислоты на обонятельную чувствительность самцов домовый мыши. *Сенсорные системы.* Т. 26 № 1. С. 52
5. Ribaut-Barassin C., Dupont J-L., Haerberlé a-M., Bombarde G., Huber G., Moussaoui S., Mariani J., Bailly Y. 2003. Alzheimer's disease proteins in cerebellar and hippocampal synapses during postnatal development and aging of the rat. *Neurosci.* V. 120. P. 405.
6. Rice D., Barone S. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* V. 108. P. 511.

© Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., 2024

## **ВОЗМОЖНОСТЬ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТЕМЕННОЙ КОРЕ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ 5xFAD**

Туманова Н.Л., Дубровская Н.М., Васильев Д.С. \*, Наливаева Н.Н.

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

\* dvasilyev@bk.ru

У 7-месячных трансгенных мышей линии 5xFAD при использовании светооптической и электронномикроскопической техники в нервной ткани теменной коры по сравнению с мышами дикого типа обнаружены признаки массивного патогенеза. У этих животных отмечались серьезные морфологические изменения. К ним относятся: гибель нейронов (хроматолиз, гиперхроматоз), а также появление многочисленных очагов с массивной продукцией амилоидного пептида с синильными бляшками и множественными агрегатами бета-амилоида в ткани теменной коры. Перечисленные признаки по структурным и ультраструктурным критериям позволяют сравнивать выявленные нарушения у трансгенных мышей с патогенезом БА у человека. У мышей 5xFAD отмечено снижение уровня экспрессии амилоид-деградирующей пептидазы неприлизин (НЕП). В наших исследованиях было обнаружено, что у трансгенных мышей имелись нарушение обоняния и памяти в тесте на распознавание нового объекта и в водном лабиринте Морриса.

Используя методы возможной фармакологической коррекции нейродегенеративных признаков в теменной коре 7-месячных мышей, мы провели пробные эксперименты по лечению этих мышей путём проведения им инъекций вальпроата натрия – ингибитора гистондеацетилаз, с целью проверки действия ингибитора гистондеацетилазы вальпроата натрия на регуляцию экспрессии нейропептидазы – неприлизина. После фармакологической коррекции у мышей 5xFAD обнаружено повышение уровня экспрессии НЕП, улучшаются поведенческие показатели в тестах распознавание нового объекта и в водном лабиринте Морриса и происходит снижение нейровоспалительного состояния за счёт уменьшения количества астроцитарной глии.

**Ключевые слова:** мыши дикого типа и трансгенной линии 5xFAD, теменная кора, ультраструктура, нейродегенерация, амилоидный пептид, вальпроат натрия, неприлизин, астроцитарная глиа, водный тест Морриса

## **POSSIBILITY OF PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF NEURODEGENERATIVE CHANGES IN PARIETAL CORTEX AND BEHAVIORAL DISORDERS IN 5xFAD TRANSGENIC MICE**

Tumanova N.L., Dubrovskaya N.M., Vasiliev D.S.\* , Nalivaeva N.N.

I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

\* dvasilyev@bk.ru

It is well known that development of neurodegeneration and especially of Alzheimer's disease (AD) is accompanied by impaired olfaction and memory loss. The neuropeptidase neprilysin (NEP), which is a principle amyloid-degrading enzyme in the brain, was shown to be one of the major enzymes involved in olfactory signalling. Previously we have demonstrated that 5xFAD mice develop olfactory deficit by the age of 6 months which correlated with reduced NEP expression in the brain area involved in olfactory signalling. The aim of this study was to analyse the effect of administration of a histone deacetylase inhibitor sodium valproate (VA) to adult 5xFAD mice on their olfaction and memory as well as on brain morphology and NEP expression in the parietal cortex (PC) in comparison with entorhinal cortex (EC) and hippocampus (Hip). The data obtained demonstrated that two-week treatment by 200 mg/kg of VA to 7 months old mice resulted in improvement of their memory in the Morris water maze as well as olfaction in the odour preference and food search tests. Using light-optical and electron microscopic methods, despite the remaining signs of neurodegeneration, a significant decrease in the number of astrocytic glia cells was detected, indicating a significant decrease in the neuroinflammatory process in the parietal cortex of transgenic mice after the administration of sodium valproate. This correlated with increased expression of NEP in the EC, PC and Hip. This suggests that NEP can be considered as an important therapeutic target in AD and olfactory loss.

**Keywords:** Wild-type and transgenic line 5xFAD mice, parietal cortex, ultrastructure, neurodegeneration, amyloid peptides, sodium valproate, neprilysin, astrocytic glia, Morris water test

### **Актуальность**

В предыдущих наших работах проводились исследование по изучению поведения и состояния нервной ткани обонятельных луковиц, гиппокампа и пириформной коры у мышей дикого типа и трансгенных мышей линии 5xFAD в возрасте 7 месяцев. У трансгенных мышей линии 5xFAD происходит снижение экспрессии НЕП как на уровне мРНК, так и белка, что колеллирует с накоплением Аβ и нарушением их обоняния и когнитивных функций (Туманова и др 2021, Vasilev et al 2021). Проведённое светооптическое и электронномикроскопическое исследование обнаружило в нервной ткани перечисленных отделов мозга мышей линии 5xFAD массивные нейродегенеративные изменения, связанные с накоплением Аβ в ткани мозга и с дефицитом содержания



и активности в нервной ткани амилоид-деградирующего фермента НЕП (Nalivaeva et al 2020 Nalivaeva Turner 2019). Все полученные факты на трансгенных мышах при разных моделях могут быть сопоставимы с аналогичными признаками БА у людей. Среди транскрипционных факторов, которые связаны с промоторами генов-мишеней и регулируются действием VA, известен растворимый цитоплазматический фрагмент предшественника амилоидного пептида AICD (Belyaev et al 2009), вовлеченный в патогенез болезни Альцгеймера (БА). В связи с этим, VA рассматривается в качестве потенциального терапевтического средства для профилактики БА и деменции. (Appleby et al 2013; Zhang et al 2022). Однако возможность нейропротекторного действия VA на зоотропной модели БА, например на трансгенных мышах линии 5xFAD ранее не подтверждалась.

В цель исследования входила экспериментальная проверка возможности фармакологической коррекции полученных дегенеративных изменений на примере нервной ткани теменной коры, а также когнитивной и обонятельной функций у взрослых животных (7 мес) с помощью ингибитора гистондеацетилаз – вальпроата натрия (VA).

### **Материалы и методы**

Исследования проводились на самцах мышей двух линий: C57Bl (дикий тип) и 5xFAD (модель патологии альцгеймеровского типа) из питомника «Черноголовка». Внутривентрикулярное введение физраствора или вальпроата натрия в физрастворе (sodium valproate, Sigma, USA, 200 мг на кг веса) осуществляли в течение минимум 30 дней.

Использовали обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей (M-MLV), затем полученная кДНК использовалась для ПЦР в реальном времени по методике, описанной в статье (Malkin et al. 2016).

В ходе светооптического исследования изготавливали срезы срезы толщиной 20 мкм следующих участков мозга теменной коры мозга (2.0–3.3 мм от Bregma в каудальном направлении) (Paxinos, Franklin, 2001). Проводили комбинированное окрашивание ткани мозга по Нисслю и красителем Конго Ред (4% водный раствор для выявления агрегатов амилоидного пептида). Проводили сопоставления между группами дикого типа и трансгенных мышей линии 5xFAD с введением вальпроата натрия или физиологического раствора, используя морфометрический анализ.

Для проведения электронной микроскопии на ультратоме Leica (Leica Microsystems, Германия) изготавливали срезы теменной коры мышей толщиной 500Å, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, США).

### **Результаты и обсуждение**

Анализ экспрессии НЕП методом ПЦР в реальном времени в структурах мозга мышей дикого типа и линии 5xFAD показал, что у трансгенных мышей линии 5xFAD наблюдалось значительное снижение содержания мРНК НЕП в теменной коре, по сравнению с диким типом.

Введение 5xFAD мышам вальпроата натрия приводило у них к усилению экспрессии НЕР в теменной коре и повышению содержания мРНК НЕР до контрольных величин.

Исследование ультраструктуры теменной коры 5xFAD мышей показало наличие нейродегенеративных изменений нейронов и их отростков, а также агрегатов Аβ. Однако, двойное окрашивание светооптическими методами (Ниссель, Конго красный) показало активацию многочисленных отростков астроцитов в теменной коре трансгенных мышей по сравнению с дикими мышами. У контрольных диких мышей астроциты окрашиваются редко, т.е. их количество в норме, минимально. Известно, что клетки астроцитарной глии осуществляют транспорт веществ из крови в нейроны и обратно. Однако после введения VA трансгенным мышам количество клеток астроцитарной глии становится значительно ниже, чем у 5xFAD мышей без его введения, а в нейропиле теменной коры остаётся много «проплешин», свободных от погибших нейронов из-за активации отростков астроцитарной глии. В центре таких «проплешин» находятся звёздчатой формы астроциты с многочисленными активированными отростками и кровеносные сосуды. Вблизи поля многочисленных отростков клеток астроцитарной глии находятся погибшие нейроны в состоянии хроматолиза либо гиперхроматоза. Проведённые нами эксперименты по фармакологической коррекции нейродегенеративных изменений в теменной коре трансгенных мышей обнаружили значительное уменьшение количества клеток астроцитарной глии. Снижается нейровоспалительный процесс, несмотря на присутствие ещё нейродегенеративных признаков и остаточных агрегатов Аβ в ткани теменной коры. Таким образом, проведённая фармакологическая коррекция с помощью вальпроата натрия показала положительную динамику в усилении экспрессии НЕР, поведенческих экспериментах и морфологических исследованиях в теменной коре трансгенных мышей. Делается вывод: следует проводить фармакологическую коррекцию вальпроатом натрия в более раннем возрасте трансгенных мышей

Исследования выполнены в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

Все эксперименты проводились на крысах в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Chen G., Yuan P.X., Jiang Y.M., Huang L.D., Manji H.K. (1999) Valproate robustly enhances AP-1 mediated gene expression. *Brain Res Mol Brain Res* 64. Pp. 52–58. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00303-9](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00303-9).
2. Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z., Turner A.J. (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep* 10. Pp. 94–100. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.222>.
3. Appleby B.S., Cummings J.L. (2013) Discovering new treatments for Alzheimer's disease by repurposing approved medications. *Curr Top Med Chem* 13. Pp. 2306–2327. <https://doi.org/10.2174/15680266113136660162>.
4. Zhang C., Sun L., Sun H. (2022) Effects of magnesium valproate adjuvant therapy on patients with dementia: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 101. e29642. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000029642>.
5. Malkin et al. // *Neuroscience*. 2016. 327: 146-155
6. Paxinos, Franklin, 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd Edition, Academic Press, San Diego.

© Туманова Н.Л., Дубровская Н.М., Васильев Д.С.,  
Наливаева Н.Н., 2024

УДК 612.82

### СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГИППОКАМПА КРЫС НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА В ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

Федорова А.М.\* , Вебер А.В., Давлетбаева А.Р.

Уфимский университет науки и технологий

\* [albinamfedorova@mail.ru](mailto:albinamfedorova@mail.ru)

Целью настоящей работы явилось исследование структурных особенностей гиппокампа головного мозга крыс на 30-е, 45-е и 90-е сутки постнатального периода жизни, на фоне воздействия нанодисперсной формы диоксида титана в дозе 10 мг/кг в эмбриональный период развития. В эксперименте использовались 40 крысят в возрасте от 0 до 90 дней. Крысята были получены от 8 самок крыс Non-linear albino, массой 170-210 г, которые в случайном порядке были поделены на группы «контроль» и «опыт». Животным контрольной группы (n=10) один раз в сутки с 1-го по 20-й день беременности вводили перорально физиологический раствор. Животным опытной группы (n=10) вводили

перорально суспензию наночастиц TiO<sub>2</sub> [40-60 нм] в дозе 10 мг/кг (ЗАО «Промхимперм», г. Пермь).

В результате исследования были получены сведения о возрастных изменениях морфологических параметров коры гиппокампа головного мозга потомства крыс, подвергшихся влиянию наночастиц TiO<sub>2</sub> в дозе 10мг/кг в период беременности, которые характеризуют наночастицы диоксида титана, как накапливающийся в организме нейротоксичный агент. Полученные данные свидетельствуют о том, что наночастицы диоксида титана могут вызывать отсроченные во времени структурные изменения строения гиппокампа головного мозга.

**Ключевые слова:** гиппокамп, онтогенез, диоксид титана, наночастицы

### **STRUCTURAL FEATURES OF THE HIPPOCAMPUS IN RAT SUBJECTED TO TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT**

Fedorova A.M. \*, Weber A.V., Davletbaeva A.R.

Ufa University of Science and Technology

\* albinamfedorova@mail.ru

The aim of this work was to study the structural features of the hippocampus of the rat brain on the 30th, 45th and 90th days of the postnatal period of life, subjected to the effect of nanodispersed titanium dioxide at a dose of 10 mg/kg during the embryonic period of development. The experiment involved 40 rat pups aged 0 to 90 days. The rat pups were obtained from 8 female Non-linear albino rats weighing 170-210 g, which were randomly divided into the "control" and "experimental" groups. The animals of the control group (n=10) were orally administered saline solution once a day from the 1st to the 20th day of pregnancy. The animals of the experimental group (n=10) were orally administered a suspension of TiO<sub>2</sub> nanoparticles [40-60 nm] at a dose of 10 mg/kg (ZAO Promkhimperm, Perm).

As a result of the study, information was obtained on age-related changes in the morphological parameters of the hippocampal cortex of the brain of the offspring of rats exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles at a dose of 10 mg/kg during pregnancy, which characterize titanium dioxide nanoparticles as a neurotoxic agent accumulating in the body. The obtained data indicate that titanium dioxide nanoparticles can cause delayed structural changes in the structure of the hippocampus of the brain.

**Keywords:** hippocampus, ontogenesis, titanium dioxide, nanoparticles

#### **Актуальность**

В последние годы возросла актуальность научных исследований по вопросам влияния на живые организмы ультрадисперсных форм различных нанодисперсных частиц, в том числе наночастиц (НЧ) диоксида титана (TiO<sub>2</sub>). Более ранние исследования определили (центральную) нервную систему как важную мишень для токсического воздействия наночастиц

металлов и оксидов металлов [5]. Эти наночастицы могут проникать в мозг, преодолевая гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), или преодолевать этот барьер посредством ретроградного транспорта через окончания обонятельных нервов [1]. У грызунов пероральное, интраназальное или внутритрахеальное воздействие наночастиц TiO<sub>2</sub> (диапазон размеров 5-100 нм) приводило к окислительному стрессу и нейровоспалению [3], нарушение регуляции глутаматергической передачи сигналов и изменения уровней нейромедиаторов [4], нарушение двигательной функции [2], снижение долговременной потенциации и нарушение обучения и память [6]. Недавние исследования показали, что наночастицы могут проникать через плацентарный барьер у беременных мышей и вызывать нейротоксичность у их потомства, но более детальное понимание воздействия наночастиц на беременных животных остается неясным. Нельзя исключить возможность передачи НЧ, присутствующих в рационе матери или используемых ею в составе косметической продукции или продуктов бытовой химии, ее потомству [8]. Количественная оценка такого переноса НЧ необходима для выявления потенциальных рисков воздействия НЧ на потомство в организме матери и разработки соответствующих защитных мер, включая гигиеническое регулирование потребительских товаров [7].

**Целью** настоящей работы явилось исследование структурных особенностей гиппокампа головного мозга крыс на 30-е, 45-е и 90-е сутки жизни, на фоне воздействия нанодисперсной формы TiO<sub>2</sub> в дозе 10 мг/кг в эмбриональный период развития.

### **Материал и методы**

В эксперименте участвовали 40 крыс в возрасте от 0 до 90 дней. Крысята были получены от 8 самок крыс Non-linear albino, массой 170-210 г, случайно поделенных на группы «контроль» и «опыт». Животным контрольной группы (n=10) один раз в сутки с 1-го по 20-й день беременности вводили перорально физиологический раствор. Животным опытной группы (n=10) вводили перорально суспензию наночастиц TiO<sub>2</sub> [40-60 нм] в дозе 10 мг/кг (ЗАО «Промхимпермь», г. Пермь). НЧ TiO<sub>2</sub> получали разведением в дистиллированной воде, полученную суспензию давали животным перорально в дозе 10 мг/кг (до 2 мг сухого вещества растворяли в 1 мл воды) при помощи шприца с удлиненным мягким наконечником. Для устранения агрегации наночастиц суспензию обрабатывали в ультразвуковой ванне. Крысы содержались в условиях вивария кафедры физиологии и общей биологии Уфимского университета науки и технологий, характеризующийся постоянством комнатной температуры (20-22°C) и уровнем влажности. Еду и воду крысы получали *ad libitum*. При работе с крысами полностью соблюдались международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (2000 год). Головной мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере и после проводки заливали

в парафин. Готовили серии фронтальных срезов мозга толщиной 10 мкм для изучения морфологических и морфометрических особенностей гиппокампа. Нейровизуализация полученных препаратов проводилась при помощи светооптического микроскопа Микмед-5 (ЛОМО, Россия). Фотографирование проводилось при помощи камеры Levenchuk C510 (5M pixels). Математико-статистическую обработки данных проводили с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA Trial» (Stat Soft Inc., США). Оценку значимости различий проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и обсуждение**

Согласно современной гистологической номенклатуре, в собственно гиппокампе выделяют три слоя: 1) молекулярный (*stratum moleculare*), 2) пирамидный (*stratum pyramidale*) и 3) краевой (*stratum oriens*) [11]. На препаратах крыс контрольной группы четко определялись поля CA1, CA2, CA3 и CA4, а также зубчатая извилина (ЗИ). Молекулярный слой клеток образован округлыми по форме перикарионов клетками, которые расположены единично. Пирамидный слой образован клетками пирамидной (треугольной) формы с четко визуализируемым ядром и одним ядрышком. Наблюдения с помощью светового микроскопа показывает, что пирамидный слой клеток полей CA1, CA2 образован клетками в 3-4 ряда. В цитоплазме нейрона отмечается характерная зернистость телец Ниссля, которые имеют пылевидное равномерное распределение, а также местами отмечены участки очагового скопления в виде мелких глыбок, что характеризует высокие энергетические процессы в клетке. Зернистый слой ЗИ образован плотно расположенными зернистыми клетками в несколько рядов.

При исследовании препаратов гиппокампа головного мозга потомства крыс опытной группы на 30-е сутки жизни были обнаружены следующие признаки деструктивных изменений: появление полиморфности в размерах нейронов, изменение их округлых форм на веретеновидные и резкая гиперхромия цитоплазмы. Нейроны пирамидного слоя зон CA1-CA2 располагались неравномерно, а их компактность была нарушена, между клетками наблюдались пустоты. Ядра пирамидных клеток темные, занимают центральное положение, контуры ядра четкие, прослеживается 1-2 ядрышка. Глиальные клетки в основном прослеживались на периферии слоя, но также и между нейронами. Необходимо отметить, что отмечены комплексы «нейрон-астроцитов», когда нейроны располагаются группами в 5-6 нейронов и на их поверхности и межнейронном пространстве определяются астроциты. Для поля CA3 и CA4 характерно то, что здесь наблюдается рыхлое расположение клеток и наличие большого межклеточного пространства. Клетки пирамидного слоя полей CA3 и CA4 опытной группы формируются нейронами с повышенной хромофобностью. В ЗИ, образованной плотно расположенными в несколько рядов зернистыми

клетками округлой формы, также обнаружено нарушение компактности нейронов и увеличение межклеточного пространства.

Исследование срезов гиппокампа контрольной и опытной групп животных на 45-е сутки жизни показало, что пирамидный слой коры гиппокампа опытной группы полей СА1, СА2 имеет меньшую плотность клеток, по сравнению с контрольной группой. В опытной группе нейроны расположены разрежено, среди них есть нейроны со сморщенными перикарионами. В нейронах отмечается уменьшение базофильной субстанции, который носит локальный или тотальный характер, такое явление характерно для патологических состояний.

В полях СА3 и СА4 гиппокампа опытной группы наблюдается рыхлое расположение пирамидных клеток. Кроме того, в полях СА3 и СА4 встречаются клетки полигональной формы и сморщенные клетки. ЗИ образована тремя слоями клеток, самая высокая плотность клеток во втором слое, который образован зернистыми клетками, разной формы. Перикарионы зернистых клеток представлены пирамидными, округлыми, веретеновидными и полигональными формами. Все сомы зернистых клеток демонстрируют широкий ободок цитоплазмы с крупными глыбками телец Ниссля, ядра занимают центральное положение.

Гиппокамп крыс контрольной группы на 90-е сутки соответствует видовой норме. У крыс опытной группы сохраняются признаки деструктивных изменений, которые были описаны на других сроках развития.

Данные о структурных нарушениях в коре гиппокампа головного мозга животных опытной группы подтверждались результатами морфометрического исследования этой структуры мозга (табл. 1). Обнаружено уменьшение в плотности расположения нейронов пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа на 9,85%, а также снижение среднего диаметра и площади перикарионов на 13,26% и 28,64% соответственно, по сравнению с контрольной группой. В пирамидном слое зоны СА2 опытной группы животных обнаружено, что диаметр перикарионов пирамидных клеток на 16,83% ниже, чем показатель у контрольной группы. Размеры перикарионов пирамидных клеток зоны СА3 гиппокампа опытной группы достоверно меньше на 13,26% в диаметре и на 28,64% в площади. Средняя плотность распределения зернистых клеток ЗИ в опытной группе меньше на 14,57% при сопоставлении с опытной группой, кроме того размеры перикарионов зернистых клеток ЗИ опытной группы достоверно меньше на 21,65% и на 41,9% в диаметре и площади соответственно.

Таблица 1

Морфометрические показатели структурных особенностей гиппокампа головного мозга крыс контрольной и опытных групп животных на 90-е сутки

Параметры, $x \pm s_x$	Контроль	Опыт	t	p
СА1				
Диаметр клетки, мкм	13,24±1,27	11,48±1,32*	3,9	0,01
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>	143,35±14,33	102,29±14,35*	3,96	0,01
Плотность распр. клеток, %	53,14±9,34	47,91±8,44*	2,69	0,01
СА2				
Диаметр клетки, мкм	12,09±1,13	9,98±1,45*	4,66	0,01
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>	111,13±13,52	98,12±10,47	1,46	0,15
Плотность распр. клеток, %	53,43±12,28	51,18±12,12	0,53	0,60
СА3				
Диаметр клетки, мкм	13,07±1,14	8,39±1,24*	11,29	0,01
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>	151,45±14,16	70,58±7,23*	8,58	0,01
Плотность распр. клеток, %	41,12±10,11	30,69±9,17*	3,11	0,01
СА4				
Диаметр клетки, мкм	10,25±1,46	9,46±2,24	1,20	0,24
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>	101,13±14,73	98,23±12,12	0,36	0,73
Зубчатая извилина				
Диаметр клетки, мкм	8,46±1,23	6,63±1,44*	3,93	0,01
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>	54,3±2,35	31,54±1,12*	5,56	0,01
Плотность распр. клеток, %	55,23±1,41	40,66±3,22*	2,35	0,02

\* – обозначены значимые различия при сравнении контрольной и опытной групп,  $p < 0,05$

Из-за разделения кровообращения матери и плода плацента действует как барьер для токсикантов окружающей среды и потенциальных патогенов, которые могут быть опасны для растущего плода [12, 10]. Тем не менее, было показано, что этот барьер малоэффективен при воздействии наночастиц TiO<sub>2</sub>, по крайней мере, у мышей и крыс, с доказательством накопления частиц в плаценте и перехода к плоду [13, 9]. Было показано, что наночастицы TiO<sub>2</sub>, перорально вводимые самкам в течение первых двух недель беременности, нарушают плацентацию и вызывают нарушение регуляции васкуляризации и пролиферации, что, возможно, приводит к изменению обмена питательных веществ и газов с плодом [15, 14]. Другие исследования на грызунах, подвергшихся пероральному [16] или внутривенному введению [14] на протяжении всего периода беременности, показали передачу наночастиц TiO<sub>2</sub> от матери к плоду. Полученные данные о морфологических особенностях коры гиппокампа головного мозга потомства крыс, подвергавшихся пероральному введению наночастиц TiO<sub>2</sub> в период беременности, согласуются с данными многих исследователей, установивших патоморфологические изменения в гиппокампе при действии на организм различных токсических соединений – уменьшение размеров перикарионов пирамидных клеток зон СА1-СА3 и ЗИ коры гиппокампа, и плотности их распределения.



## Список литературы

1. Исламов Р.А. Токсикологические и фармакологические аспекты исследований наноматериалов и нанокompозитов / Р.А. Исламов, А.К. Нерсесян // Междунар. науч.- практ. конф., посвящ. 50-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности: сб. материалов. – Алматы, 2008. – С. 128–130.
2. Шарафутдинова Л.А., Валиуллин В.В. Влияние наночастиц диоксида титана на структурные особенности гиппокампа крыс. Морфологические ведомости. 2018;26(2):32-37. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.18\(26\).02.32-37](https://doi.org/10.20340/mv-mn.18(26).02.32-37)
3. Abdelrahim, Eman A.; Eltony, Sohair A. Postnatal development of the hippocampal formation in male albino rats: histological, immunohistochemical, and morphometric studies, *The Egyptian Journal of Histology*: June 2011 - Volume 34 - Issue 2 - p 346-364 doi:10.1097/01.EHX.0000397090.34830.6a
4. Altman, J. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells [Electronic resource] / J. Altman, S. A. Bayer // *Journal of Comparative Neurology*. – 1990. – Vol. 301, iss. 3. P. 325-342. URL: <https://doi.org/10.1002/cne.903010302>.
5. Block M.L., Calderon-Garciduenas L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends in Neurosciences*. 2009; 32:506-516. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.009.
6. Chu M., Wu Q, Yang H, et al. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier. *Small*. 2010; 6(5):670-678.
7. Hong J, et al. Th2 Factors May Be Involved in TiO<sub>2</sub> NP-Induced Hepatic Inflammation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62:6871-6878. doi: 10.1021/jf501428w.
8. Sun J.L., Zhang Q, Wang ZP, Yan B. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(5):9319-9337.
9. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., et al. (2011). Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nanotechnol.* 6, 321-328. 10.1038/nnano.2011.41
10. Ze Y, et al. Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere*. 2013; 92:1183-1189. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.094.
11. Ze Y, et al. Neurotoxic characteristics of spatial recognition damage of the hippocampus in mice following subchronic peroral exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*. 2014; 264:219–229. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.10.072.
12. Delorme-Axford E., Bayer A., Sadovsky Y., Coyne C.B. Autophagy as a mechanism of antiviral defense at the maternal–fetal interface. *Autophagy* Taylor Francis. 2013;9:2173-2174. doi: 10.4161/auto.26558.
13. Rollerova E., Tulinska J., Liskova A., Kuricova M., Kovriznych J. Mlynarcikova A, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles. 2015;49:97-112.

14. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nature Nanotech.* 2011; 6:321-328. doi: 10.1038/nnano.2011.41.

15. Zhang L., Xie X, Zhou Y, Yu D, Deng Y, Ouyang J, et al. Gestational exposure to titanium dioxide nanoparticles impairs the placentation through dysregulation of vascularization, proliferation and apoptosis in mice. *IJN.* 2018; 13:777-789. doi: 10.2147/IJN.S152400.

16. Gao X., Yin S., Tang M., Chen J., Yang Z., Zhang W., et al. Effects of developmental exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on synaptic plasticity in hippocampal dentate Gyrus area: an in vivo study in anesthetized rats. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 143:1616–1628. doi: 10.1007/s12011-011-8990-4.

© Федорова А.М., Вебер А.В., Давлетбаева А.Р., 2024

УДК 616.891.616:052

## НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ СТРЕССОРНЫХ РАССТРОЙСТВ С ПОЗИЦИИ НОВОЙ КОНЦЕПЦИИ ПРИРОДЫ ЭТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Цейликман В.Э.<sup>1,2,3\*</sup>, Цейликман О.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

<sup>2</sup> Южно-Уральский государственный университет, г. Челябинск Россия

<sup>3</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

\* vadimed@yandex.ru

Посттравматические стрессорные расстройства или ПТСР являются основным вызовом современности. Помимо тяжелых психиатрических расстройств, ПТСР является еще и триггером широкого спектра заболеваний от ишемической болезни сердца вплоть до различных форм онкопатологии. К сожалению нет эффективных способов коррекции ПТСР. Нами предложена новая концепция ПТСР, которая может быть потенциальной основой патогенетической основой терапии болезни. В этой статье приводится нейробиологическое и молекулярно-генетическое обоснование концепции.

**Ключевые слова:** ПТСР, генная сеть, сенситизация, глюкокортикоиды, ресвератрол

## NEUROBIOLOGICAL ASPECTS OF POST-TRAUMATIC STRESS DISORDERS FROM THE POSITION OF A NEW CONCEPT OF THE NATURE OF THIS DISEASE

Tseilikman V.E.<sup>1,2,3\*</sup>, Tseilikman O.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

<sup>2</sup> South Ural State University, Chelyabinsk, Russia

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

\* vadimed@yandex.ru

Post-traumatic stress disorders or PTSD are the main challenge of our time. In addition to severe psychiatric disorders, PTSD is also a trigger for a wide range of diseases from coronary heart disease to various forms of oncopathology. Unfortunately, there are no effective ways to correct PTSD. We have proposed a new concept of PTSD, which can be a potential pathogenetic basis for therapy of the disease. This article provides a neurobiological and molecular genetic basis for the concept.

**Keywords:** PTSD, gene network, sensitization, glucocorticoids, resveratrol.

### **Актуальность**

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) является долгосрочным последствием тяжелого острого и/или хронического психологического стресса. Помимо поведенческих симптомов, таких как тревожность, повышенная возбудимость, гнев и страх, ПТСР часто связано с нейроэндокринными и метаболическими расстройствами и повреждением внутренних органов. Кроме того, стало ясно, что ПТСР может привести к повреждению и дисфункции органов, отличных от мозга, в частности сердца и кровеносных сосудов. Была обнаружена положительная корреляция между ПТСР и ишемической болезнью сердца и смертностью. Важно отметить, что среди переживших подобную психологическую травму, есть лица как восприимчивые, так и устойчивые к ПТСР [1, 2]. К сожалению, до сих пор нет ясного понимания природы ПТСР. Нет четких представлений ни о патогенезе ПТСР, ни о механизмах устойчивости к этому заболеванию. Эти «вызовы» мотивировали нас предложить новую концепцию ПТСР, выявляющей, основные критические звенья развития заболевания. В этой работе будут приведены её основные положения и обозначены дальнейшие перспективы ее использования для разработки новых подходов к коррекции заболевания.

Цель работы: дать нейробиологическое и молекулярно-генетическое обоснование новой концепции ПТСР.

### **Материалы и методы**

Экспериментальная модель предаторного стресса, выполненная на крысах. Для формирования хронического предаторного стресса использовали кошачью мочу. Для формирования хронического предаторного стресса использовали кошачью мочу. Крыс стрессировали ежедневно по 10 минут, в течении 10 дней. После 14 дней перерыва выполнялось тестирование поведенческой активности в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). В цельном мозге, а также в его изолированных структурах, а именно в префронтальной коре, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе, продолговатом мозге, среднем мозге, выролиевом

мосту определяли содержание моноаминов-нейротрансмиттеров и их метаболитов. В гиппокампе и стриатуме определяли экспрессии генов MAO, COMT, DAT, BDNF. В тканях мозга и печени определяли ферментативные активности MAO А, MAO Б и 11 $\beta$ ГСДГ1. Статистическая обработка результатов проводилась в пакете Statistica 13. Нормальность распределений данных проверялась с помощью процедуры Шапиро–Уилка.

### **Результаты и обсуждение**

Основные положения концепции:

1. Временная сенсбилизация (ВС) к различным ассоциациям (воспоминаниям), так или иначе связанным с пережитым стрессом (Time Dependent Sensitization), является «сердцевиной» патогенеза ПТСР.

2. Развитие временной сенсбилизации обусловлено сбоями в работе локальных генных сетей. Под генными сетями подразумевается группа одновременно и координированно работающих генов. Эти генные сети могут находиться как в пределах мозга (ПФК, гиппокамп, амигдала и т.д.), так и за его пределами.

3. В результате сбоев в работе генных сетей происходит нарушение взаимодействий между нейромедиаторами и гормонами. Последствиями этих нарушений являются тяжелые поведенческие расстройства и соматические заболевания

4. Патогенез ПТСР связан с нарушениями межорганных взаимодействий не в меньшей степени, чем с нарушениями, возникающими в пределах различных регионов головного мозга.

5. Патогенетически обоснованная терапия ПТСР должна быть направлена на устранение сбоев в генных сетях и купированию ВС.

Зависимая от времени сенсбилизация – явление, первоначально описанное Антельманом (1980) в контексте дофаминовых рецепторов, относится к каскаду событий, который продолжает развиваться в организме после того, как иницирующий стимул больше не доступен.

Временная сенсбилизация имеет собственные критерии.

ВС/ВД могут вызвать не только стрессоры высокой интенсивности и продолжительности, но даже стрессовые события, воздействующие на организм всего на несколько секунд, или на протяжении нескольких минут.

Эффекты ВС/ВД зависят от «режима стрессорного воздействия». Часто эффекты стрессора «высокой интенсивности» со временем ослабевают, а низкой интенсивности пролонгируются.

Негативные эффекты ВС со временем могут не только не ослабевать, но ещё и усиливаться.

ВС/ВД характеризуется высокой вариативностью (межиндивидуальной изменчивостью)

Из этого следует:

1. Прогностическая ценность любого маркера ПТСР определяется тем, насколько тесно он связан с ВС

2. В экспериментальных исследованиях ПТСР помимо оценки «конечной точки» полезно исследовать динамику развития заболевания

Исследование динамики постстрессорных изменений после завершения хронического ПС позволило выявить фазность поведенческих реакций. Первоначальную транзиторную анксиолитическую фазу (3 суток) сменяет временная сенсibilизация (10–14 суток). Изменения поведенческого ответа ассоциируются с изменениями уровней моноаминов-нейротрансмиттеров, активности моноаминоксидаз головного мозга, содержанием кортикостерона в крови и активностей ферментов тканевого метаболизма глюкокортикоидов (11β-ГСДГ-1 и СУРЗА)

Разработана математическая модель, в виде системы дифференциальных уравнений. В ней в качестве переменных взяты выше упомянутые экспериментальные показатели. Данные математической модели хорошо согласуются с экспериментальными данными.

В настоящее время ведутся работы для построения генных сетей ПТСР. Он основан на каскадном принципе организации и на эффектах транскрипционных факторов и микро РНК в отношении дифференциальной экспрессии генов. При этом глюкокортикоиды рассматриваются в качестве центральных организаторов генной сети. Также рассматривается возможное участие следовых аминов и нейротрансмиттеров в дестабилизации генной сети при ПТСР. Дестабилизация генной сети может развиваться вне мозга. В этом контексте анализируется роль нарушений межорганных взаимоотношений в формировании ПТСР. И наконец, из концепции следует важный принцип, звучащий следующим образом: патогенетически обоснованная терапия ПТСР базируется на коррекции сбоя в генной сети ПТСР. Нам представляется таким корректором ресвератрол, обладающий широким спектром протекторных эффектов.

Исследование поддержано региональным грантом РНФ\_Челябинская область, № 23-15-20040.

### **Список литературы**

1. Tseilikman. V., Komelkova. M., Lapshin, M., Alliluev, A., Tseilikman, O., Karpenko, M., Pestereva, N., Manukhina, E., Downey, H.F., Kondashevskaya, M., Sarapultsev, A., Dremencov, E. High and low anxiety phenotypes in a rat model of complex post-traumatic stress disorder are associated with different alterations in regional brain monoamine neurotransmission.// Psychoneuroendocrinology. 2020 v. 117(4), 104691-104697.

2. Manukhina.E., Tseilikman. V., Komelkova, M., Lapshin, M., Goryacheva, A., Kondashevskaya, M., Mkhitarov, V., Lazuko, S., Tseilikman, O., Sarapultsev, A., Dmitrieva, Y., Strizhikov, V., Kuzhel, O., Downey, H.F. Cardiac injury in rats with experimental posttraumatic stress disorder and mechanisms of its limitation in experimental posttraumatic stress disorder-resistant rats.// J Appl Physiol (1985). 2021 v. 30(3):759-771.

© Цейликман В.Э., Цейликман О.Б., 2024

## КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК S100B В КЛЕТКАХ ПРОЭПИКАРДА КРЫСЫ

Чумасов Е.И.<sup>1,2\*</sup>, Петрова Е.С.<sup>1</sup>, Коржевский Д.Э.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

\* iemmorphol@yandex.ru

Было показано, что в ранний постнатальный период развития проэпикард экспрессируют мембранные рецепторные белки к некоторым нейроиммуногистохимическим маркерам (белку PGP 9,5) и обладает прогениторными потенциями. Известно, что клетки проэпикарда новорожденных грызунов проявляют мультипотентность и являются источником многих клеточных элементов стенок коронарных сосудов (эндотелиоцитов, гладкомышечных, адвентициальных, фибробластов и хондроцитов фиброзного кольца). Цель настоящей работы состояла в изучении клеток проэпикарда в сердце крысы в ранний постнатальный период развития с применением иммуногистохимического маркера – белка S100β. Объектом исследования служило сердце крыс Вистар в возрасте 7 сут (n = 6). Выдвинуто предположение, что у крыс 7 сут. развития клетки проэпикарда через механизмы эпителиально-мезенхимальной трансформации служат источниками образования нейролеммоцитов тяжелой Ремака основной синаптической терминальной сети миокарда.

**Ключевые слова:** сердце крысы, проэпикард, ранний постнатальный онтогенез, белок S100β, нейролеммоциты

## CALCIUM-BINDING PROTEIN S100β IN RAT PROEPICARDIAL CELLS

Chumasov E.I.<sup>1,2\*</sup>, Petrova E.S.<sup>1</sup>, Korzhevskii D.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russia

\* iemmorphol@yandex.ru

It has been shown that in the early postnatal period of development the proepicardium expresses membrane receptor proteins to some neuroimmunohistochemical markers (PGP 9.5) and has progenitor potential. It is known that proepicardial cells of newborn rodents exhibit multipotency and are a source of many cellular elements of the walls of coronary vessels (endotheliocytes, smooth muscle, adventitial, fibroblasts and chondrocytes of the fibrous ring). The aim of this work was to study proepicardial cells in the rat heart in the early postnatal period of development using the immunohistochemical marker - protein S100β. The object of the study was the heart of Wistar rats aged

7 days (n = 6). It has been suggested that in rats on the 7th day of development, proepicardial cells through the mechanisms of epithelial-mesenchymal transformation serve as sources of formation of neurolemmocytes of Remak's cords of the main synaptic terminal network of the myocardium.

**Keywords:** rat heart; proepicardium; early postnatal ontogenesis; S100 $\beta$  protein; neurolemmocytes

### **Актуальность**

В последние годы в исследованиях, выполненных *in vivo* и *in vitro*, показано, что зачаток эпикарда сердца (проэпикард) в пренатальный период онтогенеза выполняет морфогенетическую функцию [1, 2]. Его клетки в процессе эпителиально-мезенхимальной трансформации дают начало развития в тканях сердца различным клеточным элементам мезодермального происхождения (эндотелиальным, гладкомышечным, фибробластоподобным, интерстициальным клеткам миокарда). Имеются данные, что в постнатальный период они активно участвуют в процессе васкулогенеза (мелких и с широкими просветами сосудов) синусоидных и обменных капилляров дефинитивного эпикарда и миокардиальной закладки, главным образом, правой половины сердца. Palmquist-Gomes et al. [2] в 2022 году показали, что проэпикардиальные клетки участвуют в образовании сердечного хрящевых и волокнистых элементов клапанного аппарата и фиброзного кольца сердца. Авторы описали образование кластеров сердечного хряща из проэпикардиальных клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. Авторы высказывают мнение о том, что проэпикардиальные клетки являются мультипотентными мультипотентными соединительными предшественниками, то есть производными мезодермального зародышевого листка.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что процессы развития тканей сердца у крыс продолжаются и после рождения в ранние сроки постнатального периода. С помощью селективного маркера эндотелиоцитов фактора Виллебранда (vWF), было установлено, что процесс образования части сосудов сердца продолжается в первые сутки новорожденности. Описано формирование везикуло-тубулярных структур, мембранных цистерн с узкими просветами и венозных синусоидных капилляров с широкими просветами, состоящих из vWF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток [3]. Ранее нами было также установлено, что клетки проэпикарда новорожденных животных экспрессируют нейроиммуногистохимический маркер белок PGP 9.5 [4]. В настоящем исследовании мы продолжили поиск нейроглиальных маркеров в клетках проэпикарда. Цель настоящей работы состояла в изучении клеток проэпикарда в сердце крысы в ранний постнатальный период развития с применением иммуногистохимического маркера – белка S100 $\beta$ .

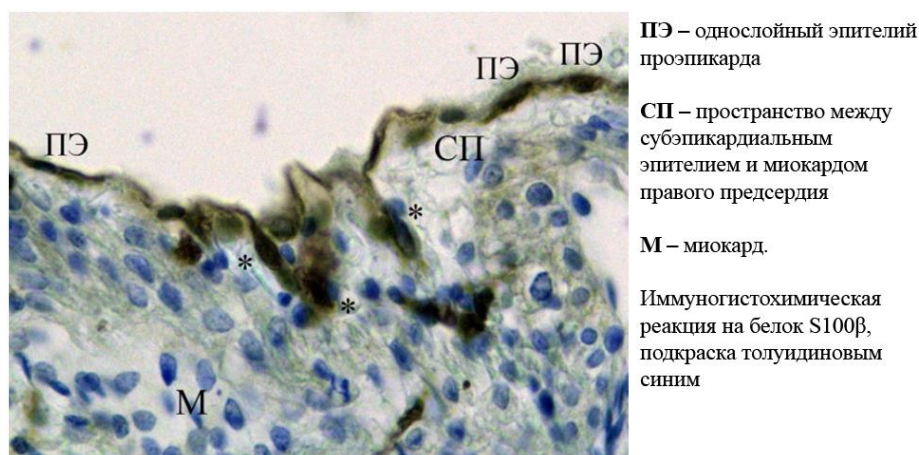
### **Материалы и методы**

В работе использовали крыс Вистар в возрасте (P7) (n = 6). При работе с животными соблюдали международные правила по гуманному

обращению с экспериментальными животными. Исследование было одобрено ЛЭК ИЭМ (№ 2/22 от 06.04.2022). Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [5]. Иммуногистохимические (ИГХ) реакции проводили на парафиновых срезах. После депарафинирования на срезы наносили первичные антитела, использовали кроличьи поликлональные антитела к белку S100 $\beta$  (Spring Bioscience, США). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). Часть препаратов окрашивали толуидиновым синим по Нислю. Для осуществления негативного контроля ИГХ-реакций на часть срезов вместо раствора первичных антител наносили их разбавитель (Dako, Denmark; сейчас Agilent, USA). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

### Результаты и обсуждение

Прозепикард у крысы в ранний постнатальный период представляет собой закладку definitivoного эпикарда и состоит из одного слоя сильно уплощенных клеток с овальным ядром и цитоплазмой, содержащей белок S100 $\beta$  (рис. 1). Сходен по гистологической классификации с эпителием. Как известно, кальций-связывающий белок S100 $\beta$  экспрессируется в глиальных клетках центральной и периферической нервной системы. Он является ИГХ-маркером, главным образом, астроцитов. Его экспрессия отмечена также в эндимиоцитах, клетках Мюллера, олигодендроцитах и шванновских клетках (нейролеммоцитах) [6]. Следует отметить, что белок S100 $\beta$  экспрессируется в некоторых типах клеток ненервного и неглиального происхождения: например, в хондроцитах, меланоцитах, адипоцитах и других [6].



*Рис. 1.* Прогениторные глиальные элементы, мигрирующие из субэпикардального пространства в миокард правого предсердия крысы Р7. х400

Иммуногистохимическая реакция на белок S100 $\beta$ , проведенная на сердце крыс Р7, позволила выявить как клетки проэпикарда, так



и предшественники нейролеммоцитов формирующегося нервного сплетения. Нами выявлены выселение клеток проэпикарда из эпикардального пласта (рис. 1) и признаки их миграции в миокард. В некоторых участках – в субмиокардиальном пространстве хорошо видны изменения формы  $S100\beta^+$  клеток (рис. 2). Среди них встречаются отростчатые клетки неправильной формы, сходные с мезенхимными элементами, клетки вытянутой и округлой формы, биполярные и звездчатые клетки. В некоторых участках эти клетки связаны друг с другом цитоплазматическими отростками и образуют «интерстициальные» сетевидные структуры. В наших предыдущих исследованиях показано, что в соответствующие сроки развития именно на самой поверхности сердца наблюдается интенсивный рост тончайших (0,1-02 мкм), «голых» тяжелой варикозных аксонов, образующих субэпикардальное нервное сплетение, состоящее из тонких пучков аксонов [4]. Последние в толще миокарда взаимодействуют с нейроглиоцитами, в результате чего образуются межмышечные сети основного терминального синаптического сплетения.

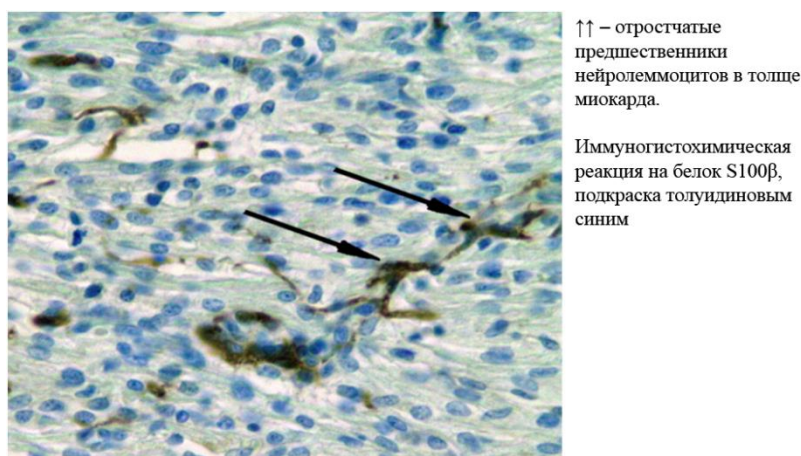


Рис. 2. Фрагмент миокарда сердца крысы Р7. х400

Как отмечалось ранее, проэпикард играет решающую роль в морфогенезе сердца [1, 2]. Он, по нашему мнению, является источником не только соединительно-тканых элементов тканей сердца, но и нейролеммоцитов – глии нервной системы органа. После формирования проэпикарда на границе прогениторного эпителия и миокарда происходит эпителиально-мезенхимальная трансформация: часть клеток проэпикарда мигрирует в миокард и дифференцируется в фибробласты, эндотелиоциты и гладкомышечные клетки и др. [1, 2]. В настоящей работе установлено, что  $S100\beta$ -иммунопозитивные клетки экспрессируются в клетках проэпикарда и нейролеммоцитах формирующегося нервного сплетения сердца. Описанные гистологические картины выселения клеток из проэпикарда в миокард позволили предположить, что проэпикард, состоящий из мультипотентных клеток-предшественников, может быть источником и нейролеммоцитов.

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что клетки проэпикарда крысы в ранний постнатальный период экспрессируют глиальный белок S100 $\beta$ , показано, что часть проэпикардальных клеток мигрирует в субэпикардальное пространство и миокард желудочков и предсердий, высказана гипотеза о возможности образования из клеток-предшественников проэпикарда нейрореммоцитов сердца.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины». Номер документа: 075-03-2024-598.

Исследование было одобрено решением Локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 2/22 от 06.04.2022).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Garriock R.J., Mikawa T., Yamaguchi T.P. Isolation and culture of mouse proepicardium using serum-free conditions // *Methods*. 2014. Vol. 66. № 3. P. 365-369. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.06.030
2. Palmquist-Gomes P., Marín-Sedeño E., Ruiz-Villalba A., Rico-Llanos G.A., Pérez-Pomares J.M., Guadix J.A. In Vivo and In Vitro Cartilage Differentiation from Embryonic Epicardial Progenitor Cells // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23. № 7. P. 3614. doi: 10.3390/ijms23073614
3. Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Проэпикард новорожденной крысы как один из возможных источников образования сосудов сердца // В сборнике: Вопросы морфологии XXI века. Сборник трудов. Под редакцией И.А. Одинцовой, С.В. Костюкевича. Санкт-Петербург, 2018. С. 254–256.
4. Чумасов Е.И., Колос Е.А., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Иммуногистохимия периферической нервной системы. СПб.: СпецЛит; 2020. 111 с.
5. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С., Карпенко М.Н., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г., Колос Е.А., Гиляров А.В. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (руководство) / (2-е издание, исправленное и дополненное). СПб.: СпецЛит, 2014. 119 с.
6. Michetti F., Clementi M.E., Di Liddo R., Valeriani F., Ria F., Rende M., Di Sante G., Romano Spica V. The S100B Protein: A Multifaceted Pathogenic Factor More Than a Biomarker // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. Vol. 24. № 9605. doi: 10.3390/ijms24119605.

© Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э., 2024

## **ВЛИЯНИЕ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ НА ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ГЛИОБЛАСТОМЫ**

Шаяхметов Р.И.<sup>1\*</sup>, Хисматуллина З.Р.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный медицинский университет,

г. Уфа, Россия

<sup>2</sup> Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, Россия

\* sheikhakhmetov@gmail.com

Глиобластома – одно из самых агрессивных злокачественных новообразований. Известно, что специфичность васкуляризации оказывает влияние на функциональное состояние микроокружения глиобластомы, которое формирует необходимые условия для прогрессирования заболевания. Целью работы было изучение особенностей васкуляризации и её влияние на функциональность микроокружения. Опухоли с выраженной степенью васкуляризации имели дезорганизованную, аномальную сеть капилляров, и отличались высоким митотическим индексом, повышенным количеством наблюдаемых ядер в поле зрения атипичных и гиперхромных глиоцитов. Таким образом, выявлено, что патоморфологическая особенность глиобластомы зависит от функционального состояния микроокружения и характера васкуляризации.

**Ключевые слова:** глиома, онкология, глиобластома, опухоли головного мозга, ангиогенез

## **INFLUENCE OF VASCULARIZATION ON GLIOBASTOMA HETEROGENEITY**

Shayakhmetov R.I.<sup>1\*</sup>, Khismatullina Z.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

\* sheikhakhmetov@gmail.com

Glioblastoma is one of the most aggressive malignant neoplasms. It is known that the specificity of vascularization influences the functional state of the glioblastoma microenvironment, which creates the necessary conditions for disease progression. The goal of the work was to study the features of vascularization and its impact on the functionality of the microenvironment. The purpose of the work was to study the characteristics of vascularization and its impact on the functionality of the microenvironment. Tumors with a pronounced degree of vascularization had a disorganized, abnormal network of capillaries, and were distinguished by a high mitotic index, an increased number of observed nuclei in the field of view of atypical and hyperchromic gliocytes. Thus, it was revealed that the pathomorphological features of glioblastoma depend on the functional state of the microenvironment and the nature of vascularization.

**Keywords:** glioma, oncology, glioblastoma, brain tumors, angiogenesis

## **Актуальность**

Вопросы онкологии являются одними из самых актуальных в мире. На сегодняшний день, смертность от онкологических заболеваний находится на втором месте, после заболеваний сердечно – сосудистой системы. Злокачественное новообразование – заболевание, которое характеризуется наличием массива бесконтрольно делящихся клеток, способных к инвазии в прилежащие ткани и метастазированию в отдельные органы, что связано с нарушением пролиферации и дифференцировки клеток вследствие генетических нарушений [1, 4].

В настоящее время заболеваемость злокачественными новообразованиями в России увеличилась на 7,6% по сравнению с 2022 годом, до 1168,9 случаев на 100 тыс. населения, смертность – на 1,8%. Показатель летальных исходов от онкозаболеваний составил по итогам 2023 года 194,3 на 100 тыс. населения (в 2022 году – 190,9). Общая заболеваемость новообразованиями в 2023 году составила 5420,2 случая на 100 тыс. населения (в 2022 году – 5191,4, прирост на 4,4%). Среди всех случаев злокачественных новообразований у взрослых, доля первичных опухолей головного мозга составляет 2% – 8 случаев на 100 тысяч. В возрастной группе до 65 лет церебральные глиомы занимают пятое место среди причин смертности от злокачественных новообразований, а у детей – второе (15-25%) и являются самыми частыми солидными опухолями.

Глиобластома – высоко агрессивное астроцитарное новообразование мозга, IV степени злокачественности, которое развивается преимущественно в подкорковом белом веществе полушарий головного мозга. На долю глиобластомы приходится 60–75% всех случаев астроцитарных новообразований [3, 6]. Существенными особенностями опухоли являются плеоморфные астроцитарные клетки, высокая митотическая активность, выраженная эндотелиальная пролиферация и наличие очагов некроза. Глиобластома характеризуется множеством генетических нарушений, вовлеченных в канцерогенез, которые в конечном итоге определяют фенотип новообразования. Несмотря на это, всего несколько сигнальных путей отвечают за инициацию онкогенеза, инвазию и выживание опухолевых клеток. Прежде всего, это сигнальные пути, связанные с рецепторами факторов роста (эпидермального, сосудистого, тромбоцитарного, фибробластов, стволовых клеток, гепатоцитов), которые чаще всего вовлечены в опухолевую прогрессию глиобластомы. Гетерогенное микроокружение опухоли включает в себя множество неопухолевых клеток, таких как эндотелиальные и иммунные клетки, астроциты, нейроны, а также компоненты внеклеточного матрикса, которые играют решающую роль в прогрессировании заболевания, оказывая воздействие на рост новообразования, ее инфильтрацию и устойчивость к терапии [2].

## **Материалы и методы**

Для исследования были взяты гистологические материалы, полученные интродермическим путем, у 10 пациентов с подозрением на первичные

супратенториальные образования глиального ряда. Приготовление гистологических препаратов включало в себя несколько этапов: взятие материала, фиксация, обезвоживание, промывка, уплотнение, нарезание препарата, окрашивание, просветление и заключение срезов. Морфометрический анализ был проведён с использованием программы TourView. Статистическая обработка полученных данных была выполнена в программе «STATISTICA» v.8.0.

### Результаты и обсуждение

Для глиобластомы характерна высокая васкуляризация, что отличает ее от опухолей с меньшей степенью злокачественности. Сосудистая сеть опухоли характеризуется извилистыми и дезорганизованными сосудами (рис. 1Б). Кровоснабжение обеспечивается двумя типами сосудов: сосудами, образующимися в результате ангиогенеза (неоангиогенные сосуды), и первичные сосуды, которые на начальных этапах роста подпитывают опухолевые клетки (кооптированные сосуды). Стоит отметить, что сосуды отличаются более тонкой неоформленной стенкой и нарушенной связью с отростками неопухолевых астроцитов (рис. 1А). Такие сосуды напрямую питают опухоль, а также способствуют прогрессированию и инвазии опухолевых клеток [5]. Напротив, во время кооптации сосудов, раковые клетки растут вдоль уже существующих кровеносных сосудов, образуя структуры в виде псевдопалисадов или псевдорозеток (рис. 1В). Эти сосуды, как правило, отличаются склерозированной эндотелиальной стенкой, более плотной базальной мембраной, признаками тромбообразования и малым кровенаполнением (рис. 1Г).

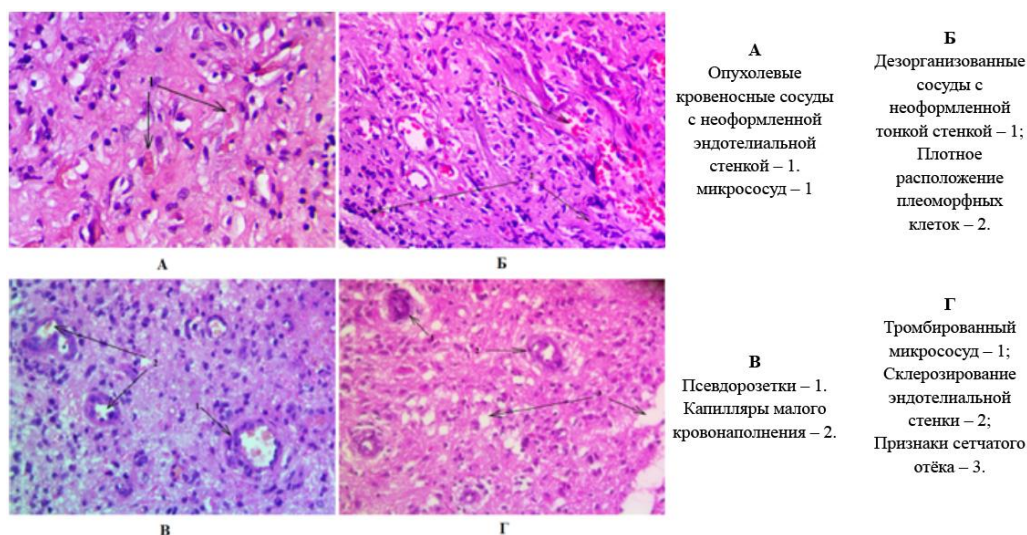


Рис. 1. Окраска гематоксилин - эозин. Увеличение х400

В ходе изучения особенностей кровеносной системы глиобластомы, были оценены морфофункциональные состояния ядер микроокружения опухоли (рис. 2). Так, образцы с выраженной сосудистой пролиферацией (рис. 2А) отличались более тесными клеточными контактами, что

отражалось в количестве наблюдаемых ядер в поле зрения (рис. 2Б). Помимо этого, обширная площадь кровоснабжения коррелирует с частотой ядерной атипии (рис. 2В), высокой митотической активностью (рис. 2Г) и массивом гиперхромных ядер в опухоли (рис. 2Д). Напротив, случаи апоптозов (рис. 2З) и тромбообразования в сосудах встречались реже.

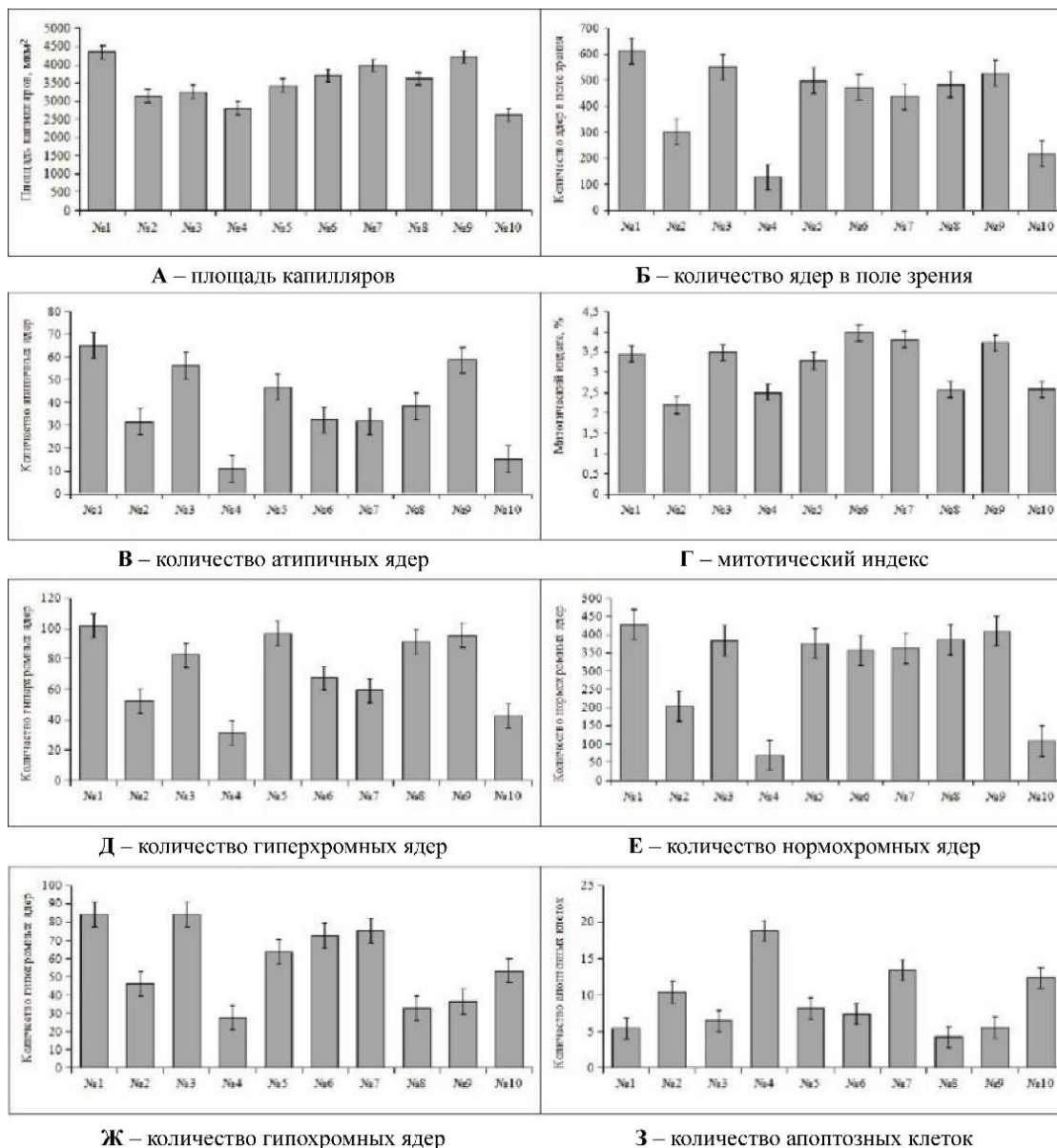


Рис. 2. Соотношение площади кровоснабжения и морфофункционального состояния клеток

Опухоли с низкой васкуляризацией характеризовались меньшей численностью ядер в поле зрения (рис. 2Б), в результате увеличения межклеточных промежутков на фоне сетчатого отёка. Заметно преобладание числа гипохромных ядер (рис. 2Ж) по отношению к плеоморфным и гиперхромным клеткам. Были отмечены частые апоптозы (рис. 2З) и зоны некроза, между тем, случаи митозов наблюдались значительно реже (рис. 2Г).



## Заключение

Прогрессирование и инвазия глиобластомы связана с хорошо развитой сосудистой пролиферацией, что позволяет опухоли моделировать условия, необходимые для развития заболевания.

Таким образом, опухоли с выраженной степенью васкуляризации имеют дезорганизованную, аномальную сеть капилляров, и отличаются высоким митотическим индексом, количеством наблюдаемых ядер в поле зрения, в том числе атипичных и гиперхромных, но при этом с низким показателем апоптозов и некрозов. Напротив, образцы с меньшим кровоснабжением характеризуются частыми тромбозами, склерозированием и расслоением эндотелиальных стенок, редкими митозами, низким числом наблюдаемых клеток с частыми апоптозами и обширными областями отёка и некроза.

Гистологическая картина глиобластомы зависит от многих факторов. Б.Б. Жетписбаев и соавт. при изучении патоморфологии глиобластом, выявили морфоструктурные различия у опухолей с мутацией в гене *IDH-1* [1]. Вероятно, такие различия могут возникать не только в следствии генетических нарушений, но и из-за гетерогенности микроокружения и характера васкуляризации.

## Список литературы

1. Жетписбаев Б.Б., Рыскельдиев Н.А., Ауэзова Р.Ж., Кожаметова А.О., Исаханова Б.А. Патоморфология глиобластом в зависимости от обнаружения мутаций гена IDH-1 // Нейрохирургия и неврология Казахстана. 2016. № 1 (42). С. 10–13.
2. Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z, Zhou Q. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis // European journal of cancer (Oxford, England: 1990). 2013. Vol. 49. No. 18. Pp. 3914–3923.
3. D'Alessio A., Proietti G., Lama G., Biamonte F., Lauriola L., Moscato U., Vescovi A., Mangiola A., Angelucci C., Sica G. Analysis of angiogenesis related factors in glioblastoma, peritumoral tissue and their derived cancer stem cells // Oncotarget. 2016. Vol. 7. No. 48. Pp. 78541–78556.
4. Hovis G., Chandra N., Kejriwal N., Hsieh K.J., Chu A., Yang I., Wadehra M. Understanding the role of endothelial cells in glioblastoma: mechanisms and novel treatments // International journal of molecular sciences. 2024. Vol. 25. No. 11:6118.
5. Lee J.S., Lee H.J., Moon B.H., Song S.H., Lee M.O., Shim S.H., Kim H.S., Lee M.C., Kwon J.T., Fornace A.J. Jr., Kim S.U., Cha H.J. Generation of cancerous neural stem cells forming glial tumor by oncogenic stimulation // Stem cell reviews and reports. 2012. Vol. 8. No. 2. Pp. 532–545.
6. Shiras A., Chettiar S.T., Shepal V., Rajendran G., Prasad G.R., Shastry P. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma // Stem cell (Dayton, Ohio). 2007. Vol. 25. No. 6. Pp. 1478–1489

**РЕЦЕПТОР ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА:  
УЧАСТИЕ В СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ, АКТИВАЦИЯ  
ГОНАДОТРОПИНАМИ И АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ**

Шпаков А.О.\* , Деркач К.В.

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

\*alex\_shpakov@list.ru

Ключевым регулятором функций гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси у мужчин и женщин является лютеинизирующий гормон (ЛГ), который специфично связывается с рецептором ЛГ, локализованным в клетках Лейдига семенников и в фолликулярных клетках яичников. Он вырабатывается аденогипофизом на ответ на стимулирующее воздействие на гонадотрофы гипоталамического фактора – гонадолиберина. Структурным и функциональным гомологом ЛГ является хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Активация рецептора ЛГ с помощью ЛГ или ХГЧ приводит к запуску нескольких сигнальных каскадов, реализуемых через различные типы G-белков и  $\beta$ -аррестинов, что приводит к широкому спектру физиологических ответов. Паттерн активации рецептора ЛГ при действии на него ЛГ и ХГЧ существенно различается, и это обусловлено различным сродством гонадотропинов к ортостерическому сайту, расположенному во внеклеточном домене рецептора. Важную роль в модуляции активности рецептора ЛГ и сопряженных с ним сигнальных каскадов играют аллостерические механизмы, в том числе опосредуемые образованием молекулой рецептора различных гомо- и гетероди(олиго)мерных комплексов. В настоящее время разрабатываются синтетические аллостерические агонисты рецептора ЛГ на основе низкомолекулярных гетероциклических соединений. Наибольшую активность среди них демонстрируют производные тиено[2,3-d]-пиримидина, в том числе разработанные нами соединения ТР03 и ТР04. Их преимуществами по отношению к ЛГ и ХГЧ являются избирательное и умеренное воздействие на внутриклеточные сигнальные каскады, сохранение активности при пероральном способе введения и отсутствие негативного влияния на гипоталамические и гипофизарные звенья гонадной оси. Эти соединения могут быть использованы для коррекции андрогенного дефицита у мужчин и как индукторы овуляции у женщин.

**Ключевые слова:** рецептор лютеинизирующего гормона, тиено[2,3-d]-пиримидин, аллостерический сайт, овуляция, тестикулярный стероидогенез



# LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR: PARTICIPATION IN SIGNAL TRANSDUCTION, ACTIVATION BY GONADOTROPINS AND ALLOSTERIC REGULATION

Shpakov A.O. \*, Derkach K.V.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

\* alex\_shpakov@kist.ru

A key regulator of the functions of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in men and women is luteinizing hormone (LH), which specifically binds to the LH receptor localized in the Leydig cells of the testes and in the follicular cells of the ovaries. It is produced by the adenohypophysis in response to the stimulating effect of the hypothalamic factor gonadoliberin on gonadotrophs. The structural and functional homologue of LH is human chorionic gonadotropin (hCG). Activation of the LH receptor by LH or hCG triggers several signaling cascades through various types of G proteins and  $\beta$ -arrestins, resulting in a wide range of physiological responses. At the same time, the pattern of activation of the LH receptor under the influence of LH and hCG on it differs significantly, and this is due to the different affinity of gonadotropins for the orthosteric site located in the extracellular domain of the receptor. Allosteric mechanisms, including those mediated by the formation of various homo- and heterodi(oligo)meric complexes by the receptor molecule, play an important role in modulating the activity of the LH receptor and the signaling cascades associated with the receptor. Currently, synthetic allosteric agonists of the LH receptor based on low molecular weight heterocyclic compounds are being developed. The greatest activity among them is demonstrated by thieno [2,3-d]-pyrimidine derivatives, including the compounds TP03 and TP04 developed by us. Their advantages over LH and hCG are a selective and moderate effect on intracellular signaling cascades, preservation of activity when administered orally, and the absence of a negative effect on the hypothalamic and pituitary parts of the gonadal axis. These compounds can be used to correct androgen deficiency in men and as ovulation inducers in women.

**Keywords:** luteinizing hormone receptor, thieno [2,3-d]-pyrimidine, allosteric site, ovulation, testicular steroidogenesis

Рецептор лютеинизирующего гормона (ЛГ) относится к суперсемейству рецепторов, сопряженных с гетеротримерными G-белками (GPCR), и после связывания с гормоном – ЛГ или структурно близким ему хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ), он переходит в активированное состояние и стимулирует функциональную активность различных типов G-белков ( $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$ ) и адаптерных белков  $\beta$ -аррестинов. В результате запускается сразу несколько внутриклеточных сигнальных каскадов [1]. Так при активации  $G_s$ -белка осуществляется стимуляция фермента аденилатциклазы, катализирующего образование вторичного посредника цАМФ, который в свою очередь активирует протеинкиназу А

и нижележащие цАМФ-зависимые эффекторные белки и транскрипционные факторы. Необходимо отметить, что вызываемая гонадотропинами цАМФ-зависимая сигнализация играет ключевую роль в активации тестикулярного и овариального стероидогенеза, вовлечена в модуляцию пролиферативной активности клеток в семенниках и яичниках, их выживаемости, а также контролирует процессы овариального ангиогенеза и созревания ооцитов, регулируя их вхождение в мейоз [2, 3]. Активация  $G_{i/o}$ -белков приводит к ингибированию гонадотропин-стимулированной аденилатциклазы и затуханию цАМФ-зависимых сигнальных путей, что можно рассматривать, как механизм наиболее быстрой отрицательной обратной связи, реализуемой непосредственно на уровне клетки, мишени гонадотропинов. При активации  $G_{q/11}$ -белка повышается активность фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы  $C\beta$ , катализирующей образование инозитол-3,4,5-трифосфата и диацилглицерина. Инозитол-3,4,5-трифосфат взаимодействует со специфичными к нему рецепторами, локализованными в ретикулярных мембранах, что приводит к высвобождению ионов кальция из внутриклеточных депо и активации множества  $Ca^{2+}$ -зависимых эффекторных белков, ответственных за клеточный метаболизм и экспрессию кальций-зависимых генов. Диацилглицерин, в свою очередь, стимулирует форбол-чувствительные изоформы протеинкиназы  $C$ , мишенями которых является широкий спектр белков, вовлеченных в процессы пролиферации и апоптоза. Тем самым, в семенниках активируемые гонадотропинами  $G_{q/11}$ -белок-опосредуемые каскады вовлечены в модуляцию тестикулярного стероидогенеза, процессов роста и дифференцировки тестикулярных клеток, в то время как в яичниках они участвуют в формировании и созревании фолликула, обеспечивают нормальное протекание овуляции, надлежащим образом регулируя активацию прогестероновых рецепторов и следующий за этим разрыв фолликула [4, 5]. Еще один, независимый от  $G$ -белков путь, реализуемый через рецептор ЛГ, включает активацию  $\beta$ -аррестинов, которые выполняют две основные функции. Первая состоит в обеспечении эндоцитоза комплекса гонадотропин–рецептор ЛГ внутрь клетки в составе ранней эндосомы, в результате чего рецептор либо подвергается протеосомной деградации, либо рециклизуется и транслоцируется в мембрану, где он снова готов связываться с гонадотропином. Тем самым, регулируется плотность функционально активных рецепторов ЛГ на поверхности клеток, от чего зависит их чувствительность к ЛГ и ХГЧ. Вторая функция  $\beta$ -аррестинов состоит в их способности участвовать в сигнальной трансдукции, функционируя в качестве трансдукторных компонентов в активации каскада митогенактивируемых протеинкиназ (МАПК) и 3-фосфоинозитидного пути, включающего фосфатидилинозитол-3-киназу и Akt-киназу [2]. До сих пор не выяснен вопрос, является ли сигнальная функция  $\beta$ -аррестинов независимой от  $G$ -белков, или требует согласованной работы с ними.

Как отмечалось выше, эндогенными активаторами рецептора ЛГ являются ЛГ, продуцируемый аденогипофизом в ответ на стимуляцию гонадолиберином, и ХГЧ, продуцируемый плацентой в первом триместре беременности. В последние годы открыта гипофизарная форма ХГЧ, которая выявляется, начиная с пубертатного периода, и у мужчин, и у женщин. Секреция гипоталамическими нейронами гонадолиберина находится под контролем большого числа нейрогормонов, одни из которых положительно влияют на выброс гонадолиберина (кисспептин, меланокортины) или, напротив, подавляют его синтез и секрецию (агути-подобный пептид, нейропептид Y).

ЛГ и ХГЧ с высоким сродством связываются с ортостерическим сайтом, расположенным во внеклеточном домене рецептора. Этот домен включает два субдомена – LRR-субдомен, содержащий 9 повторов, обогащенных остатками лейцина (LRR1–LRR9), и шарнирную область, соединяющую LRR-субдомен с трансмембранным доменом. Шарнирная область ограничена с N- и C-концов повторами LRR10 и LRR11, между которыми расположены  $\alpha$ -спираль 272–280, и протяженная петлеобразная структура. После связывания гонадотропинов с ортостерическим сайтом меняется конформация шарнирной области и ее взаимодействие как с внеклеточными петлями трансмембранного домена, так и с внешним вестибюлем, формирующим вход в трансмембранный канал рецептора, сформированный семью гидрофобными трансмембранными спиральями. Следствием этого является переход рецептора ЛГ в активированное состояние и запуск внутриклеточных сигнальных каскадов. Важную роль здесь играет участок P10, локализованный на C-конце шарнирной области, который рассматривается как «внутренний» агонист рецептора ЛГ. Этот участок при активации рецептора гонадотропином высвобождается и способствует изменению суперпозиции пятой, шестой и седьмой гидрофобных спиралей рецептора, что, в свою очередь, меняет конформацию цитоплазматических сайтов, связывающих G-белки и  $\beta$ -аррестины, давая старт сигнальной трансдукции [6].

Несмотря на структурное сходство ортостерического сайта, вовлеченного в специфическое связывание ЛГ и ХГЧ, сродство этих гонадотропинов к рецептору ЛГ различается – в случае ХГЧ оно заметно выше, чем в случае ЛГ. Это приводит к отчетливо выраженным различиям в паттерне конформационных изменений шарнирной области и в ее взаимодействии с трансмембранным доменом при связывании рецептора ЛГ с различными гонадотропинами. Этим во многом обусловлены существенные различия в селективности активации ЛГ и ХГЧ внутриклеточных сигнальных каскадов и, как следствие, различные физиологические ответы клеток-мишеней на действие этих гонадотропинов. Так действие ХГЧ направлено в основном на активацию  $G_s$ -белков и стимуляцию сопряженных с ними цАМФ-зависимых путей, в то время как ЛГ примерно в одинаковой степени активирует сигнальные каскады, реализуемые как через  $G_s$ -, так и через  $G_{q/11}$ -белки. Существенные

различия отмечаются и в отношении активации каскада МАПК, Так в фолликулярных клетках ЛГ в значительной степени стимулирует активность киназ ERK1/2, эффекторного звена каскада МАПК, тем самым усиливая рост этих клеток, в то время как ХГЧ практически не влияет на активность ERK1/2 и, вызывая чрезмерную стимуляцию цАМФ-зависимых путей, подавляет пролиферативные процессы в фолликулярных клетках [7]. Установлено также, что ХГЧ с большей интенсивностью в сравнении с ЛГ активирует  $\beta$ -аррестины, что приводит к повышенной десенситизации рецепторов ЛГ и запускает процессы эндоцитоза лиганд-рецепторных комплексов. Тем самым, обработка клеток с помощью ХГЧ вызывает быструю потерю ими чувствительности к эндогенным гонадотропинам. Сравнительно низкая активность ЛГ в отношении  $\beta$ -аррестинов обеспечивает низкий уровень интернализации и даун-регуляции рецепторов ЛГ, даже при длительном воздействии гонадотропина, и, тем самым, способствует сохранению чувствительности клеток-мишеней к эндогенному ЛГ, препятствуя истощению пула функционально активных рецепторов и в плазматической мембране, и во внутриклеточных компартментах [8].

Имеются веские основания считать, что в основе различий в регуляторных эффектах ЛГ и ХГЧ лежат в том числе и аллостерические механизмы. Среди них, различия во влиянии гонадотропинов на конформационную подвижность и паттерн взаимодействий участка P10, являющегося «внутренним» агонистом рецептора ЛГ, с трансмембранным доменом, а также различия в смещении гидрофобных спиралей трансмембранного домена относительно друг друга, приводящие к различной пространственной организации цитоплазматических аллостерических сайтов и их доступности для G-белков и  $\beta$ -аррестинов. В этой связи необходимо отметить, что G-белки,  $\beta$ -аррестины и ряд других регуляторных белков, образующих комплексы с цитоплазматическими доменами GPCR, включая рецептор ЛГ, функционируют как их аллостерические регуляторы.

Однако роль аллостерической регуляции рецепторов ЛГ выходит далеко за рамки различий в эффективности и селективности гонадотропинов. Для многих GPCR установлено, что их аллостерическими регуляторами могут быть простые ионы ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , и др.), холестерин и другие мембранные липиды, аминокислоты и их производные, причем аллостерические сайты, взаимодействующие с этими регуляторами, располагаются в различных компартментах рецепторной молекулы – во внеклеточных петлях, внутри трансмембранного канала и снаружи от него, в месте контакта трансмембранного домена с липидной фазой мембраны, а также в цитоплазматических петлях [9,10]. В различных локусах рецептора ЛГ идентифицированы участки, которые потенциально способны взаимодействовать с различными по природе аллостерическими регуляторами, в том числе с ионами натрия и холестерином, но их возможная роль в модуляции активности рецептора ЛГ до настоящего

времени не изучена. В то же время установлено регуляторное влияние комплексообразования на активность рецептора ЛГ. В этой связи необходимо отметить, что протомеры одного или различных типов GPCR в составе комплекса аллостерически влияют друг на друга, тем самым, модулируя аффинность рецептора к ортостерическим агонистам, эффективность и селективность сигнальной трансдукции [11]. На различных стадиях развития фолликулов существенно меняется соотношение различных димерных и олигомерных форм рецептора ЛГ, причем на ранних стадиях значительная часть рецепторов ЛГ существует в виде гетерокомплексов с рецепторами фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), вследствие чего они даже могут активироваться ФСГ. На стадии овуляции такие гетерокомплексы исчезают, и практически весь пул рецепторов ЛГ представлен гомоди(олиго)мерными комплексами. Это позволяет повысить эффективность воздействия ЛГ на фолликулярные клетки, что необходимо для полноценной овуляции.

Особый интерес представляет разработка низкомолекулярных аллостерических агонистов рецептора ЛГ, которые связываются с аллостерическим сайтами (или сайтами), расположенным внутри трансмембранного канала рецептора. Необходимо отметить, что во многих GPCR внутри этого канала располагается ортостерический сайт, но в рецепторе ЛГ, как и в рецепторах других гипофизарных гликопротеиновых гормонов, этот сайт свободен [10, 11]. Нами и другими авторами на протяжении последних лет ведется разработка таких агонистов на основе структуры различных гетероциклических соединений [10–15]. Наибольшей эффективностью характеризуются производные тиено[2,3-d]-пиримидинов, в том числе разработанное голландскими учеными соединение Org43553 [12], и разработанные нами соединения TP03 и TP04 [14, 15]. Важно, что производные тиено[2,3-d]-пиримидинов более мягко, в сравнении с ХГЧ, стимулируют тестикулярный и овариальный стероидогенез, и потому не приводят к гиперактивации стероидогенных путей и десенситизации рецепторов ЛГ. Так при введении половозрелым и неполовозрелым самкам крыс соединения TP03 и TP04 не вызывали снижения экспрессии рецептора ЛГ, что указывает на сохранение чувствительности яичников к эндогенному ЛГ, не приводили к гиперстимуляции стимулирующего овариальный ангиогенез фактора роста эндотелия сосудов, что предотвращает развитие синдрома гиперстимуляции яичников, и при этом характеризовались сравнимой с ХГЧ способностью вызывать овуляцию [15]. Оба соединения, как и соединение Org43553, были эффективны как при внутрибрюшинном, так и при пероральном введении, что объясняется их устойчивостью в желудочно-кишечном тракте и способностью в неизменном виде всасываться клетками кишечника. Нами установлено, что при совместном введении гонадотропинов и производных тиено[2,3-d]-пиримидинов их стероидогенные эффекты сохраняются и даже характеризуются частичной аддитивностью. Это обусловлено тем, что сайты их связывания в молекуле

рецептора ЛГ разделены – связывание низкомолекулярного агониста с аллостерическим сайтом внутри трансмембранного канала практически не влияет на связывающие характеристики внеклеточного ортостерического сайта. Нами также показано, что тиено[2,3-d]-пиримидиновые производные с активностью агонистов рецептора ЛГ лишь в небольшой степени влияют на секрецию гонадолиберина гипоталамическими нейронами и на продукцию ЛГ и ФСГ аденогипофизом, что обусловлено их сравнительно мягким стероидогенным эффектом, и это отличает их от ХГЧ, который подавляет активность гипоталамических и гипофизарных звеньев гонадной оси. Отсутствие ряда побочных эффектов у тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных может быть связано с тем, что они являются более селективными по отношению к внутриклеточным каскадам, стабилизируя какую-то одну активную конформацию рецептора, ответственную за взаимодействие с определенным типом G-белка или  $\beta$ -аррестина [10].

Таким образом, активация рецептора ЛГ приводит к активации широкого спектра внутриклеточных сигнальных каскадов в тестикулярных и овариальных клетках, что обусловлено способностью рецептора функционально взаимодействовать с различными типами G-белков и  $\beta$ -аррестинов. Выбор и соотношение этих каскадов, а значит и физиологический ответ клетки, во многом определяются типом гонадотропина (ЛГ или ХГЧ), воздействующего на рецептор ЛГ, а также множественными аллостерическими влияниями на функциональную активность рецептора, в том числе обусловленными формированием его гомо- и гетероди(олиго)мерных комплексов. Расшифровка аллостерических механизмов регуляции рецептора ЛГ позволила разработать низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ЛГ, которые имеют ряд преимуществ при сравнении с фармакологическими препаратами гонадотропинов. Среди них более избирательное и умеренное воздействие на внутриклеточные сигнальные каскады, активность при пероральном способе введения и отсутствие негативного влияния на гипоталамические и гипофизарные звенья гонадной оси. Низкомолекулярные аллостерические агонисты могут быть использованы для коррекции андрогенного дефицита у мужчин с гипогонадотропным гипогонадизмом и как индукторы овуляции у женщин во вспомогательных репродуктивных технологиях при осуществлении процедуры экстракорпорального оплодотворения.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда (проект № 19-75-20122).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

1. Riccetti L., Yvinec R., Klett D., Gallay N., Combarnous Y., Reiter E., Simoni M., Casarini L., Ayoub M. A. Human Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin Display Biased Agonism at the LH and LH/CG Receptors // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. No. 1. P. 940.
2. Casarini L., Simoni M. Recent advances in understanding gonadotropin signaling // *Faculty reviews*. 2021. Vol. 10. P. 41.
3. Kilanowska A., Ziółkowska A., Stasiak P., Gibas-Dorna M. cAMP-Dependent Signaling and Ovarian Cancer // *Cells*. 2022. Vol. 11. No. 23. P. 3835.
4. Mejia R., Waite C., Ascoli M. Activation of Gq/11 in the mouse corpus luteum is required for parturition // *Molecular Endocrinology*. 2015. Vol. 29. No. 2. Pp. 238–246.
5. Johnson G.P., Jonas K.C. Mechanistic insight into how gonadotropin hormone receptor complexes direct signaling // *Biology of Reproduction*. 2020. Vol. 102. No. 4. Pp. 773–783.
6. Duan J., Xu P., Cheng X., Mao C., Croll T., He X., Shi J., Luan X., Yin W., You E., Liu Q., Zhang S., Jiang H., Zhang Y., Jiang Y., Xu H. E. Structures of full-length glycoprotein hormone receptor signalling complexes // *Nature*. 2021. Vol. 598. No. 7882. Pp. 688–692.
7. Gupta C., Chapekar T., Chhabra Y., Singh P., Sinha S., Luthra K. Differential response to sustained stimulation by hCG & LH on goat ovarian granulosa cells // *The Indian journal of medical research*. 2012. Vol. 135. No. 3. Pp. 331–340.
8. Lei Y., Hagen G.M., Smith S.M., Liu J., Barisas G., Roess D.A. Constitutively-active human LH receptors are self-associated and located in rafts // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007. Vol. 260-262. Pp. 65–72.
9. Hedderich J.B., Persechino M., Becker K., Heydenreich F.M., Gutermuth T., Bouvier M., Bünemann M., Kolb P. The pocketome of G-protein-coupled receptors reveals previously untargeted allosteric sites // *Nature Communications*. 2022. Vol. 13. No. 1. Pp. 2567.
10. Shpakov A.O. Allosteric Regulation of G-Protein-Coupled Receptors: From Diversity of Molecular Mechanisms to Multiple Allosteric Sites and Their Ligands // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. No. 7. Pp. 6187.
11. Lazzaretti C., Simoni M., Casarini L., Paradiso E. Allosteric modulation of gonadotropin receptors // *Frontiers in endocrinology (Lausanne)*. 2023. Vol. 14. Pp. 1179079.
12. van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor // *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2008. Vol. 378. No. 5. Pp. 503–514.
13. Derkach K.V., Dar'in D. V., Lobanov P.S., Shpakov A.O. Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases

the testosterone level in male rats // Doklady Biological Sciences. 2014. Vol. 459. Pp. 326–329.

14. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N., Steepochkina A.M., Romanova I.V., Morina I.Y., Zakharova I.O., Bayunova L.V., Shpakov A.O. The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 23. No. 1. P. 198.

15. Derkach K.V., Lebedev I.A., Morina I.Y., Bakhtyukov A.A., Pechalnova A.S., Sorokoumov V.N., Kuznetsova V.S., Romanova I.V., Shpakov A.O. Comparison of Steroidogenic and Ovulation-Inducing Effects of Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor in Immature Female Rats // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. No. 23. P. 16618.

© Шпаков А.О., Деркач К.В., 2024

УДК 577.2; 615.357; 615.21

**ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ПЕПТИДОВ,  
ПРОИЗВОДНЫХ 5-НТ1В- И 5-НТ6-СЕРОТОНИНОВЫХ  
РЕЦЕПТОРОВ, НА 5-НТ1В- И 5-НТ6-ОПОСРЕДУЕМУЮ  
РЕГУЛЯЦИЮ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В СТРИАТУМЕ МОЗГА  
КРЫС**

Шпаков А.О.\* , Деркач К.В., Шпакова Е.А.

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

\* alex\_shpakov@list.ru

Серотониновые рецепторы 1В-подтипа (5-НТ1В-R) и 6-го типа (5-НТ6-R) играют важную роль в функционировании ЦНС, а нарушения их активности ведут к неврологическим расстройствам. Одним из подходов для восстановления их активности является применение пептидов, структурно соответствующих цитоплазматическим петлям этих рецепторов и наделенных агонистической активностью. Целью работы было исследовать влияние интраназального введения разработанных нами ранее пальмитоилированных пептидов 307–316 5-НТ1В-R и 258–268 5-НТ6-R на активность аденилатциклазы (АЦ) в стриатуме мозга крыс, в сравнении с интраназально вводимыми ортостерическими агонистами этих рецепторов – SR93129 и EMD-386088. Интраназальное введение пептидов (50 мкг/крысу) сохраняло АЦ ответ в стриатуме как к этим пептидам, так и к ортостерическим агонистам. В то же время, введение SR93129 и EMD-386088 (10 мкг/крысу) значительно ослабляло АЦ эффекты пептидов и самих ортостерических агонистов, особенно 5-НТ6-R-агониста EMD-



386088. Тем самым, пептиды 307–316 5-HT<sub>1B</sub>-R и 258–268 5-HT<sub>6</sub>-R можно рассматривать, как перспективные препараты для коррекции неврологических заболеваний.

**Ключевые слова:** серотонин, серотониновый рецептор, аллостерический агонист, стриатум, аденилатциклаза

## **EFFECT OF INTRANASALLY ADMINISTERED PEPTIDES DERIVED FROM 5-HT<sub>1B</sub> AND 5-HT<sub>6</sub> SEROTONIN RECEPTORS ON THE ACTIVITY OF THE ADENYLATE CYCLASE SYSTEM IN THE RAT BRAIN**

Shpakov A.O. \*, Derkach K.V., Shpakova E.A.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

\* alex\_shpakov@list.ru

Serotonin receptors of the subtype 1B (5-HT<sub>1B</sub>-R) and type 6 (5-HT<sub>6</sub>-R) play an important role in the functioning of the CNS, and disturbances in their activity lead to neurological disorders. One of the approaches to restore their activity is the use of peptides that structurally correspond to the cytoplasmic loops of these receptors and have agonistic activity. The aim of the work was to study the effect of intranasal administration of the previously developed palmitoylated peptides 307–316 5-HT<sub>1B</sub>-R and 258–268 5-HT<sub>6</sub>-R on the activity of adenylate cyclase (AC) in the striatum of the rat brain, in comparison with intranasally administered orthosteric agonists of these receptors, such as CP93129 and EMD-386088. Intranasal administration of peptides (50 µg/rat) preserved the AC response in the striatum to both these peptides and orthosteric agonists. At the same time, administration of CP93129 and EMD-386088 (10 µg/rat) significantly weakened the AC effects of the peptides and the orthosteric agonists, especially the 5-HT<sub>6</sub>-R-agonist EMD-386088. Thus, peptides 307–316 5-HT<sub>1B</sub>-R and 258–268 5-HT<sub>6</sub>-R can be considered as promising drugs for the correction of neurological diseases.

**Keywords:** serotonin, serotonin receptor, allosteric agonist, striatum, adenylate cyclase

### **Актуальность**

Серотониновые рецепторы 1B-подтипа (5-HT<sub>1B</sub>-R) и 6-го типа (5-HT<sub>6</sub>-R) играют ключевую роль в функционировании ЦНС. Нарушения функций 5-HT<sub>1B</sub>-R приводят к депрессивным расстройствам и мигрени [1], в то время как снижение 5-HT<sub>6</sub>-R-опосредуемой сигнальной трансдукции является причиной когнитивного дефицита, биполярных расстройств, шизофрении [2]. Вследствие этого актуальной является разработка селективных агонистов этих рецепторов. Однако существующие препараты не лишены побочных эффектов, а их применение приводит к десенситизации рецепторов и снижению их экспрессии в различных отделах мозга. Более мягкими активаторами 5-HT<sub>1B</sub>-R и 5-HT<sub>6</sub>-R могут

стать аллостерические регуляторы, как с агонистической активностью, так и с активностью позитивных аллостерических модуляторов [3, 4]. Одним из подходов для их создания является синтез пептидов, производных функционально важных участков цитоплазматических петель (ЦП) рецепторов, сопряженных с G-белками, к которым относятся 5-НТ1В-Р и 5-НТ6-Р. Ранее нами были синтезированы и исследованы модифицированные пальмитатом пептиды, производные третьей ЦП этих рецепторов, которые *in vitro* стимулировали активность аденилатциклазы (АЦ) в синапсомембранных мембранах, выделенных из тканей мозга крыс [5, 6]. АЦ, катализирующая образование цАМФ, является основной мишенью агонистов 5-НТ1В-Р и 5-НТ6-Р, причем 5-НТ1В-Р-агонисты ингибируют активность АЦ (через Gi-белки), в то время как 5-НТ6-Р-агонисты ее стимулируют (через Gs-белки). Однако активность пептидов в условиях *in vivo* не изучалась. Целью работы было исследовать влияние интраназально вводимых пальмитоилированных пептидов ARERKATKTL(307–316)K 5-НТ1В-Р и KHSRKALKASL(258–268)KA 5-НТ6-Р на чувствительность АЦ в мембранных фракциях стриатума мозга крыс к ортостерическим и аллостерическим агонистам этих рецепторов. Интраназальное введение было выбрано потому, что оно обеспечивает доставку пептидов непосредственно к структурам мозга, предотвращая их протеолиз

в кровотоке и проблемы с транспортом через гематоэнцефалический барьер.

#### **Материалы и методы**

Пептиды были синтезированы с помощью твердофазной стратегии с использованием ВОС-производных аминокислот и охарактеризованы с помощью аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрии высокого разрешения. Модификацию пептидов пальмитатом осуществляли по остатку лизина, локализованному на С-конце пептидной цепи. Для экспериментов использовали трехмесячных самцов крыс Wistar, которые находились в стандартных условиях вивария. Животным интраназально вводили по 50 мкг каждого пептида, декапитацию крыс и забор тканей мозга (стриатума) для выделения из них синапсомембранных мембран и оценки активности АЦ проводили через 1 ч после введения препаратов. Исследовали 5 групп крыс (в каждой по 5 животных) – контроль (без введения пептидов и агонистов), с введением пальмитоилированного пептида 307-316 5-НТ1В-Р (группа 5-НТ1В), с введением пальмитоилированного пептида 258–268 5-НТ6-Р (5-НТ6), с введением селективного 5-НТ1В-Р-агониста CP93129 в дозе 10 мкг/крысу (CP) и селективного 5-НТ6-Р-агониста EMD-386088 в дозе 10 мкг/крысу (EMD). Выбор доз CP93129 и EMD-386088 обусловлен данными, представленными в работах [7, 8]. Фракции синапсомембранных мембран из стриатума выделяли, как описано ранее [6]. Для этого ткани гомогенизировали при помощи Политрона в охлажденном до 4°C Tris-HCl буфере (pH 7.5), содержащем 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10% сахарозу и ингибиторы протеаз. Полученный гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин), осадок отбрасывали,

супернатант повторно центрифугировали (9 000 g, 20 мин), осадок ресуспендировали в том же буфере, но без сахарозы, и повторно центрифугировали (35 000 g, 10 мин). Активность АЦ определяли, как описано ранее [6], используя в качестве субстрата меченый [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-АТФ. Реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °С, стартуя с добавления фракции мембран. Образовавшийся [ $^{32}\text{P}$ ]-цАМФ отделяли на колонках с оксидом алюминия, радиоактивность считали на сцинтилляционном счетчике LS 6500 («Beckman Instruments Inc.», США). Результаты представляли в пмоль цАМФ/мин на мг мембранного белка. Для оценки ингибирующего АЦ эффекта 5-НТ1В-Р-пептида и СР93129 фермент предварительно стимулировали форсколином. Статистический анализ проводили с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007», данные представляли, как  $M \pm SD$ . Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали  $t$ -критерий Стьюдента, для сравнения 3 и более выборок – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

### Результаты и обсуждение

В стриатуме контрольных животных были показаны ингибирующие эффекты как 307–316 5-НТ1В-Р ( $10^{-5}$  М), так и селективного 5-НТ1В-Р-агониста СР93129 ( $10^{-8}$  М) на форсколин-стимулированную активность АЦ, причем эффект пептида был сопоставим с таковым СР93129 (табл. 1). Эти данные свидетельствуют об эффективности регуляторного влияния на АЦ систему как аллостерического регулятора, действующего на внутриклеточный сайт рецептора (пептид 307–316 5-НТ1В-Р), так и агониста его ортостерического сайта (СР93129). У животных, обработанных интраназально вводимым пептидом 258–268 5-НТ6-Р, существенных изменений в регуляции АЦ исследуемыми 5-НТ1В-Р-агонистами выявлено не было. Это указывает на то, что активация 5-НТ6-Р пептидом, производным этого рецептора, практически не влияет на 5-НТ1В-Р-опосредуемые пути. У крыс группы 5-НТ1В отмечались небольшие, хотя и значимые, изменения в АЦ эффектах 5-НТ1В-Р-агонистов, что указывает на сохранение значительной части активных 5-НТ1В-Р на поверхности нейронов при введении 307–316 5-НТ1В-Р (табл. 1). В то же время, обработка крыс СР93129 приводила почти к полному блокированию ингибирующего АЦ эффекта этого агониста к значительному снижению АЦ эффекта пептида 307–316 5-НТ1В-Р (табл. 1). Это может быть обусловлено интенсивной даун-регуляцией 5-НТ1В-Р после обработки крыс СР93129 и значительным снижением их числа в синапсомембранных мембранах стриатума. Интересно, что эти эффекты не были специфичны в отношении избранного нами для изучения стриатума, и отмечались также в коре и гиппокампе (данные не представлены).

Таблица 1.

Ингибирующие эффекты пептида 307–316 5-НТ1В-R ( $10^{-5}$  М) и 5-НТ1В-R-агониста СР93129 ( $10^{-8}$  М) на форсколин-стимулированную активность АЦ в синаптосомальных мембранах стриатума мозга крыс с введением пептидов или ортостерических агонистов серотониновых рецепторов

Группа крыс	Без воздействий	307–316 5-НТ1В-R	СР93129
	Активность АЦ, пмоль цАМФ/мин/мг белка		
К	426 ± 26	286 ± 27*	265 ± 26*
5-НТ1В	477 ± 22	359 ± 31*	337 ± 32*
СР	492 ± 19	402 ± 20*#	438 ± 40#
5-НТ6	419 ± 18	297 ± 26*	244 ± 19*
EMD	401 ± 29	264 ± 21*	255 ± 15*

*Примечание.* Базальная АЦ активность в стриатуме контрольных крыс составила  $41.7 \pm 2.8$  пмоль цАМФ/мин/мг белка, в других группах она существенно от этого значения не отличалась. Стимулирующий АЦ эффект форсколина (1 мМ) в различных группах составил от 778 до 886% (в контроле – 823%). \* – по сравнению с пробами без воздействий, # – по сравнению с контрольными крысами.  $M \pm SD$ .  $n = 5$ .

Пептид 258-268 5-НТ6-R и ортостерический 5-НТ6-R-агонист EMD-386088 стимулировали активность АЦ в мембранах, выделенных из стриатума мозга контрольных крыс, хотя действие пептида было выражено слабее (табл. 2). В мембранах крыс группы 5-НТ1В отмечали некоторое усиление эффекта EMD-386088, в то время как в группе СВ различий с контролем выявлено не было. У крыс, интраназально получавших пептид 258-268 5-НТ6-R, отмечали тенденцию к снижению эффектов пептида и EMD-386088, но различия не были значимыми (табл. 2). В то же время в группе EMD стимулирующие АЦ эффекты обоих агонистов 5-НТ6-R ослаблялись, причем эффект пептида 258–268 5-НТ6-R полностью утрачивался (табл. 2). Тем самым, обработка EMD-386088 ингибирует ответ 5-НТ6-R как к аллостерическому, так и к ортостерическому агонисту.

Подводя итоги, пептиды, производные 5-НТ1В-R и 5-НТ6-R, сравнительно слабо влияют на чувствительность серотониновой системы стриатума к агонистам этих рецепторов, и это обусловлено более мягким их регуляторным влиянием на рецепторы и нижележащие пострецепторные звенья серотонинового сигналинга по сравнению с ортостерическими агонистами. Это позволяет рассматривать их, как потенциальные лекарственные препараты для коррекции неврологических расстройств.

Таблица 2.

Стимулирующие АЦ эффекты пептида 258–268 5-НТ6-R ( $10^{-5}$  М) и 5-НТ6-R-агониста EMD-386088 ( $10^{-8}$  М) в стриатуме мозга крыс с введением пептидов или ортостерических агонистов

серотониновых рецепторов

Группа крыс	Без воздействий	258–268 5-НТ6-R	EMD-386088
	Активность АЦ, пмоль цАМФ/мин/мг белка		
К	41.7 ± 2.9	73.2 ± 4.8*	110.8 ± 6.3*
5-НТ1В	43.0 ± 5.6	79.1 ± 2.9*	135.2 ± 5.1*#
СР	44.8 ± 3.0	74.8 ± 1.7*	119.6 ± 7.2*
5-НТ6	40.5 ± 2.5	65.1 ± 4.5*	97.2 ± 7.5*
EMD	39.5 ± 3.7	49.0 ± 4.8	73.2 ± 6.0*#

*Примечание.* \* – по сравнению с пробами без воздействий, # – по сравнению с контрольными крысами.  $M \pm SD$ .  $n = 5$ .

Работа поддержана госзаданием ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

Все процедуры при работе с животными соответствовали принципам European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и рекомендациям биоэтического комитета ИЭФБ РАН.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Tiger M., Varnäs K., Okubo Y., Lundberg J. The 5-НТ1В receptor – a potential target for antidepressant treatment // *Psychopharmacology (Berl)*. 2018. Vol. 235. No. 5. Pp. 1317–1334.
2. Nirogi R., Jayarajan P., Shinde A., Mohammed A.R., Grandhi V.R., Benade V., Goyal V.K., Abraham R., Jasti V., Cummings J. Progress in Investigational Agents Targeting Serotonin-6 Receptors for the Treatment of Brain Disorders // *Biomolecules*. 2023. Vol. 13. No. 2. 309.
3. Fasciani I., Petragano F., Aloisi G., Marampon F., Carli M., Scarselli M., Maggio R., Rossi M. Allosteric Modulators of G Protein-Coupled Dopamine and Serotonin Receptors: A New Class of Atypical Antipsychotics // *Pharmaceuticals*. 2020. Vol. 13. 388.
4. Saito A., Alvi S., Valant C., Christopoulos A., Carbone S.E., Poole D.P. Therapeutic potential of allosteric modulators for the treatment of gastrointestinal motility disorders // *Br. J. Pharmacol*. 2022. doi: 10.1111/bph.16023.
5. Shpakov A. O., Tarasenko I. I., Shpakova E. A. Peptides derived from the third cytoplasmic loop of type 6 serotonin receptor as regulators of serotonin-sensitive adenylyl cyclase signaling system // *Dokl Biochem Biophys*. 2010. Vol. 431. Pp. 94-97.

6. Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I., Derkach K.V., Vlasov G.P. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2010. Vol. 16. Pp. 95-105.

7. Fujita S., Kiguchi M., Lee J., Terakado M., Suga K., Hatanaka H., Koshikawa N. 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors in the ventrolateral striatum differentially modulate apomorphine-induced jaw movements in rats // J Oral Sci. 2008. Vol. 50. No. 4. Pp. 387–395.

8. Aparicio-Nava L., Tellez R., Gonzalez R., Liy-Salmeron G., Meneses A. Intrahippocampal administration of 5-HT<sub>6</sub> receptor drugs on memory consolidation and amnesia protocols // Behav Brain Res. 2019. Vol. 359. Pp. 378–385.

© Шпаков А.О., Деркач К.В., Шпакова Е.А., 2024

При подготовке электронного издания использовались следующие программные средства:

- Adobe Acrobat – текстовый редактор;
- Microsoft Word – текстовый редактор.

Все права защищены. Книга или любая ее часть не может быть скопирована, воспроизведена в электронной или механической форме, в виде фотокопии, записи в память ЭВМ, репродукции или каким-либо иным способом, а также использована в любой информационной системе без получения разрешения от издателя. Копирование, воспроизведение и иное использование книги или ее части без согласия издателя является незаконным и влечет уголовную, административную и гражданскую ответственность.

*Научное издание*

**СОВРЕМЕННАЯ НЕЙРОБИОЛОГИЯ:  
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

*Сборник статей*

*III Всероссийской конференции с международным участием  
(г. Уфа, 26 – 27 сентября 2024 г.)*

*Электронное издание сетевого доступа*

*За достоверность информации, изложенной в статьях,  
ответственность несут авторы.*

*Статьи публикуются в авторской редакции*

Подписано к использованию 18.11.2024 г.  
Гарнитура «Times New Roman». Объем 6,93 Мб.  
Заказ 191.

*ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий»  
450008, Башкортостан, г. Уфа, ул. Карла Маркса, 12.*

Тел.: +7-908-35-05-007  
e-mail: ric-bdu@yandex.ru