БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

«Современная нейробиология: фундаментальные исследования и практические аспекты»

Материалы Всероссийской конференции, посвященной памяти профессора Калимуллиной Лилии Барыевны

(г. Уфа, 19-20 октября 2022 г.)

УФА
РИЦ БашГУ
2022

УДК 581.4.591.4.576.31.581.1
ББК 28.06.28.073
С56

Редакционная коллегия:
д-р биол. наук, профессор **З.Р. Хисматуллина** *(отв. ред.);*
канд. биол. наук, доцент **А.М. Федорова** *(отв. секретарь);*
канд. биол. наук, доцент **И.И. Садртдинова**;
ассистент **Файрушина А.И**;
ассистент **Давлетбаева А.Р.**

С56 **«Современная нейробиология: фундаментальные исследования и практические аспекты»**: материалы Всероссийской конференции, посвященной памяти профессора Калимуллиной Лилии Барыевны (г. Уфа, 19-20 октября 2022 г.) / отв. ред. З.Р. Хисматуллина. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2022. – 353 с.
ISBN

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 978-5-7477-5545-1

© БашГУ, 2022

УДК: 612.821
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.1

В ПАМЯТЬ О КАЛИМУЛЛИНОЙ ЛИЛИИ БАРЫЕВНЕ

© Хисматуллина З.Р. *, Ахмадеев А.В., Федорова А.М.
Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия
hismatullinazr@mail.ru

Аннотация. Миндалевидный комплекс (МК) вовлечён в центральные механизмы регуляции широкого круга физиологических процессов, начиная от деятельности отдельных органов до целостных поведенческих актов, определяющих адаптацию организмов, их пищевое и половое поведение [2]. Его место в лимбической системе определяется ключевой ролью в анализе полисенсорной информации, поступающей из внешней и внутренней среды организма с последующим переключением её на висцеральные центры ствола головного мозга и его высшие отделы - зрительный бугор, неокортекс. Важна роль МК в модуляции нейроэндокринной и иммунной систем.

Ключевые слова: миндалевидный комплекс, нейроэндокринный центр, лимбическая система.

IN MEMORY OF KALIMULLINA LILIIA BARYEVNA

© Khismatullina Z.R. *, Akhmadeev A.V., Fedorova A.M.
Bashkir State University, Ufa, Russia
hismatullinazr@mail.ru

Abstract. The amygdala complex (AM) is involved in the central mechanisms of regulation of a wide range of physiological processes, ranging from the activity of individual organs to integral behavioral acts that determine the adaptation of organisms, their feeding and sexual behavior [2]. Its place in the limbic system is determined by its key role in the analysis of polysensory information coming from the external and internal environment of the body with its subsequent switching to the visceral centers of the brain stem and its higher sections - the thalamus, neocortex. The role of UA in the modulation of the neuroendocrine and immune systems is important.

Keywords: amygdala complex, neuroendocrine center, limbic system.
.

Заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, почётный работник высшего профессионального образования Российской Федерации, доктор биологических наук, профессор Калимуллина Лилия Барыевна родилась 19 октября 1941 года в Уфе в семье известного архитектора Калимуллина Барый Гибатовича (10.04.1907-21.07.1989).

Калимуллина Л.Б. является ведущим ученым России в области функциональной морфологии и нейроэндокринологии миндалевидного комплекса мозга, неоднократно удостаивалась научной стипендии Президента РФ для выдающихся ученых РФ. За время работы в Башкирском государственном университете создана научная школа, которая успешно работает над решением фундаментальных проблем деятельности мозга. Исследования имеют мировой приоритет, а также формируют необходимый базис для решения актуальных социальных проблем республики в области наркомании, тяжелой невропатологии, сохранения здоровья населения. Автор более шестисот научных работ, среди которых восемь монографий, авторское свидетельство и четыре патента РФ, публикации в ведущих российских и зарубежных журналах.

Калимуллина Лилия Барыевна закончила Башкирский медицинский институт (БМИ) с отличием в 1964 году. Обучение в институте успешно совмещала с научной работой. По воспоминаниям Лилии Барыевны:

«Мне посоветовали включиться в научно-исследовательскую работу. На третьем курсе я выбрала кружок по патологической анатомии. Тогда кафедрой заведовал профессор Виктор Александрович Жухин, который приехал к нам в институт из Ашхабада. Он был одним из ведущих патологоанатомов страны, был знаком со столичными учеными, которые его очень уважали.

Предложил тему научно-исследовательской работы. Она была посвящена бластомогенности башкирской нефти. В это же время я освоила технику приготовления гистологических препаратов».

После окончания института была приглашена в аспирантуру В.А. Жухиным, работу над кандидатской диссертацией выполняла на базе Института гигиены труда и профзаболеваний. Кандидатская диссертация, посвященная изучению гистологических изменений кожи, вызываемых диметилсульфоксидом, патологических изменений, возникающие при экспериментальном отравлении диметилсульфидом и диметилсульфоксидом была успешно защищена на совете при институте в 1968 году. Работа получила положительные отзывы оппонентов.

Свою трудовую деятельность Лилия Барыевна начала в должности ассистента кафедры патанатомии БМИ, желание продолжать научную деятельность подтолкнуло устроиться прозектором в патологоанатомическое отделение РКБ. Со слов самой Лилии Барыены, работа прозектром давалась очень тяжело, поэтому когда ей поступило предложение профессора А.С. Дмитриева и доцента Д.И. Смирнова перейти работать в классический университет, на биологический факультет, где предложили преподавать морфологические дисциплины кафедры, она перешла на кафедру физиологии человека и животных. Это случилось в 1971 году. На протяжении 44 лет работы на кафедре прошла путь от старшего преподавателя до заведующего кафедрой, на должность которого была избрана в 1991 году. За годы работы в университете подготовила ряд общих курсов: «Анатомия человека», «Гистология», «Цитология», «Эмбриология», «Биология человека» и спецкурсов: «Морфология мозга», «Морфология миндалевидного комплекса мозга», «Нейроанатомия», «Нейрогистология», «Нейробиология медиаторных систем мозга», «Эволюционные аспекты нейробиологии», «Актуальные проблемы морфологии и патофизиологии нервной системы», «Общий гистологический практикум», по которым читала лекции и проводила лабораторные занятия.

В начале семидесятых начала заниматься научной работой по ретикуло - эндотелиальное системе гипоталамо-гипофизарной системы. Эту тема была рекомендована Ильдар Ганиевичем Акмаевым. Но вскоре от этой темы пришлось отказаться, при этом инициатором изменения темы был сам Ильдар Ганиевич, который сказал, что нужно переключаться на более актуальную тему, а именно, лимбическую систему.

По инициативе И.Г. Акмаева Калимуллина Лилия Барыевна прошла стажировку в Институте мозга РАМН, в Институте физиологии им. И.П. Павлова в Ленинграде. Знакомясь с литературой по лимбической системе, были прорабатаны источники как по миндалевидному комплексу, так и по гиппокампу, а также перегородке мозга, изучала гипоталамическую область. Но вскоре поняла, что с таким большим объемом просто не справиться, и нужно сконцентрировать свое внимание на чем-то одном. Тогда было принято решение заниматься миндалевидным комплексом мозга. Эта область привлекла внимание Лилии Барыевны, т.к. в знаниях о ее строении было много неясных вопросов, и главный среди них – это соотношение подкорковых и корковых структур.

В семидесятые годы прошлого столетия миндалевидный комплекс мозга самостоятельно почти не изучался, а всегда рассматривался как часть лимбической системы, и в нем дифференцировали две части – кортикомедиальный и базолатеральный отделы. Экспериментальной работе предшествовал литературный обзор, где Лилией Барыевной были систематизированы существующие данные о структурной организации миндалевидного комплекса мозга.

Акмаев И.Г. одобрил начало исследований по миндалевидному комплексу, и предложил заняться гистофизиологией: проведение кариометрии нейронов зон миндалевидного комплекса (МК) после гонадэктомии. Лилия Барыевна в своих записях отмечала, что «после раздумий я поняла, что кариометрии должна предшествовать большая работа, которая должна была позволить выработать стандартизацию зон кариометрии. Т.е. занимаясь кариометрией, у меня должна была быть уверенность, что я имею дело с тождественными скоплениями нейронов. Выработкой методики я занялась на непрерывной серии срезов мозга крысы. Изучая срезы, я старалась найти отличительные признаки тех или иных срезов, при продвижении от носа крысы к затылку. Опираясь на эти отличительные признаки (информативные), я составила карту структурной организации МК. Позднее научно обосновать разработанную схему позволила теория распознавания образов, математический аппарат которой применил для решения задачи математик из Бирска Хайдар Аюпович Калкаманов. Эта разработка до сих пор является высокоинформативной, способной лечь в основу методологии изучения МК. Она опубликована в 2015 году в журнале США. Надеюсь, что она со временем станет широко известной, способной унифицировать получаемые в эксперименте результаты исследований по структурно-функциональной организации МК».

В докторской диссертации были проведены исследования по кариометрии нейронов пятидесяти зон МК у групп животных, которые подвергались гонадэктомии (у самцов и самок, при этом материал брали для исследования через 14 дней и месяц после операции). Были проведены исследования в динамике эстрального цикла.

После защиты докторской диссертации в 1991 году, была избрана заведующей кафедрой физиологии человека и животных. Заведовала кафедрой 20 лет, за это время все сотрудники кафедры стали кандидатами наук, а также было защищено 2 докторских диссертации (Хисматуллина З.Р. и А.В. Ахмадеев). Кафедра постоянно была участником выполнения научных тем, финансируемых

Минобразования РФ, выигрывала гранты. Калимуллиной Л.Б. присвоили звание «Заслуженного профессора БашГУ» за многолетнюю плодотворную работу на кафедре и успехи в научно-исследовательской работе.

В 1998-2000 годах благодаря поддержке Профессора МГУ Сергея Александровича Чепурнова кафедра вошла в число участников выполнении международного гранта, в котором участвовал Наймигенский университет (Нидерланды), МГУ, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и наш университет. Благодаря финансам этого гранта наша кафедра получила интересных экспериментальных животных – крыс линии WAG/Rij. С помощью генетиков был генотипирован у них локус Taq 1 A DRD2. Проведена селекция, и выведены две линии крыс с генотипами A1/A1 и A2/A2 по этому локусу гена. Проведенные исследования дали очень интересные результаты, большая часть из них систематизирована в диссертациях Федоровой А.М. и Н.Ф. Леушкиной.

Многолетний труд Лилии Барыены получил общественное признание. В 2002 году Указом Президента РБ присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки РБ», в 2003 году награждена Почетной грамотой Минобрнауки РФ, в 2005 году присвоено звание «Почетный работник высшего профессионального образования РФ». В 2011 году присвоено звание «Заслуженный профессор Башгосуниверситета». Кафедра морфологии и физиологии человека и животных БашГУ награждена в 2012 году Европейской научно-промышленной палатой дипломом качества, а Калимуллина Л.Б. - золотой медалью Европейской научно-промышленной палаты. В 2014 году Калимуллина Л.Б. с группой молодых ученых награждена дипломом и золотой медалью участника Московского Международного салона образования.

Многие проблемы, имеющие место в структурно-функциональной организации МК, не решены. Калимуллиной Лилей Барыевне и ее ученикам удалось систематизировать результаты своих исследований, были написаны обзорные работы.

Миндалевидный комплекс (МК) представляет собой одну из структур конечного мозга, которую традиционно относят к системе базальных ядер. Более внимательное рассмотрение структурной организации этой области мозга позволяет заметить в ней особенность, отличающую ее от обычной модели организации базальных ядер: помимо ядерного принципа в организации МК можно выделить также экранный, свойственный организации оптических центров и корковых формаций головного мозга [4].

Миндалевидный комплекс (МК) вовлечён в центральные механизмы регуляции широкого круга физиологических процессов, начиная от деятельности отдельных органов до целостных поведенческих актов, определяющих адаптацию организмов, их пищевое и половое поведение [2]. Его место в лимбической системе определяется ключевой ролью в анализе полисенсорной информации, поступающей из внешней и внутренней среды организма с последующим переключением её на висцеральные центры ствола головного мозга и его высшие отделы - зрительный бугор, неокортекс [1,4, 7]. Важна роль МК в модуляции нейроэндокринной и иммунной систем.

Своеобразие строения МК является отражением эволюционных преобразований, происходивших в этом участке головного мозга в процессе его длительного исторического развития. Возникнув на самых ранних этапах формирования головного мозга как центр для анализа обонятельных импульсов, он становится в последующем территорией, на которой появляются первые формации древней коры.

Древняя кора (обонятельная или палеокортекс) имеет четкие критерии для идентификации [2]. К ним относятся: 1) стратификация скоплений клеток (число тангенциальных слоев должно быть не менее трех, один из них плексиформный); 2) четкая радиальная и тангенциальная исчерченность слоев, предопределяемая упорядоченным расположением отростков и тел нейронов; 3) наличие пространственного градиента в топографии афферентных и эфферентных систем волокон. Указанные критерии позволили нам в процессе цитоархитектонического анализа выделить среди структур МК формации древней коры. К ним отнесится ядро латерального обонятельного тракта, периамигдалярная кора и пириформная кора. Ядро латерального обонятельного тракта находится в переднем отделе МК, периамигдалярная кора – в составе центрального и заднего отделов, пириформная кора покрывает латеробазальную поверхность полушария и входит в состав всех отделов МК[4].

Большинство структур МК носит характер типичных ядер, т.е. представляет собой компактные скопления нервных клеток. Это центральное ядро, вставочные массы, латеральное и базолатеральное ядра и др. Однако среди структур МК есть немало и переходных формаций, занимающих промежуточное положение между ядерным и экранным принципом организации серого вещества нервной системы. Такими межуточными формациями [5] являются переднее кортикальное ядро и заднее кортикальное ядро. Подробно разработанная эволюционно-морфологическая классификация

структур МК нашла отражение в работе [4]. На единство ядер и палеокортикальных структур в МК указывает и их партнерство в формировании основных систем волокон этого образования мозга. Известно, что основные связи МК с другими структурами мозга идут в составе конечной полоски и вентрального амигдалофугального пути. Последний, несмотря на свое название, так же как и конечная полоска, представляет собой систему двусторонних связей МК, гипоталамуса, центров ствола мозга и ряда других структур. В многочисленных исследованиях показано, что обе эти системы формируются за счет аксонов нервных клеток, как ядер, так и формаций древней коры. В большей степени это характерно для вентрального амигдалофугального пути (филогенетически более молодой системы), который начинается от периамигдалярной и пириформной коры, пронизывает ядра базолатеральной группы и через переднюю амигдалярную область достигает латеральной гипоталамической области, где вступает в медиальный пучок конечного мозга [4,6]. Это только небольшая частичка тех исследований, которые проводила Лилия Барыевна, и были еще громадные планы впереди. Но…

16 ноября 2020 года после коварной болезни Лилии Барыевны Калимуллиной не стало…

На сегодняшний день кафедра физиологии и общей биологии продолжает развивать научное направление, которое заложила Калимуллина Лилия Барыена. Работы сотрудников и студентов кафедры получают высокую оценку на всероссийских и международолных конференциях.

И каждый сотрудник, которому посчастливилось работать с Лилией Барыевной, помнит о ее наставлениях, самодисциплине, подходу к работе, организованности и конечно же о большой любви к науке.

Литература

1. Akhmadeev A.V., Kalimullina L.B. Structural-functional organization of cart peptide-expressing neurons in the amygdaloid body of the brain // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2015. Т. 45. № 6. С. 701-703.
2. Pigache R. M. //Adv. Anat. Embryol. And Cell Biol. 1970, -V. 43, № 6, -p. 1.
3. Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. М.,Наука,1993, 272 с.

4. Калимуллина Л.Б. Морфология миндалевидного комплекса мозга. Уфа, БашГУ, 1987. 86с.
5. Любашина О.А. Механизмы амигдалофугальной модуляции ваговагального рефлекса. Тез. док. межд.конф. «Механизмы функционирования висцеральных систем». СПб.-2001.с.225.
6. Хисматуллина З.Р., Калимуллина Л.Б. Ультраструктурная характеристика нейронов миндалевидного комплекса мозга // Вестник Оренбургского государственного университета. 2008. № 10 (92). С. 240-243.
7. Чепурнов С А., Чепурнова Н.Е. Нейропептиды и миндалина М.: Изд-во МГУ, 1985. 128с.

© Хисматуллина З.Р., Ахмадеев А.В. Федорова А.М., 2022

УДК: 612.8.04
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.2

ВЛИЯНИЕ ЦЕНТРАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ МИНДАЛИНЫ НА РЕГУЛЯЦИЮ ГЕМОДИНАМИКИ КРЫС В ПОКОЕ И ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КЛЮКОКОРТИКОИД-ИНДУЦИРОВАННОГО СТРЕССА

© Бакулина Е.И.*, Романова И.Д.
Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва, Самара, Россия
* bakulinae@inbox.ru

Аннотация. Явление стресса и его основные субстраты (нейрохимические и нейроанатомические) стрессовой реакции в настоящий момент изучены весьма подробно, Тем не менее, природа и механизм воздействия лимбической системы в целом и миндалины в частности на процесс реализации стресс-реакции остаются открытыми. В статье рассмотрены аспекты участия центральных отделов миндалевидного комплекса в гемодинамических реакциях в процессе реализации глюкокортикоид-индуцированной стресс-реакции. Исследование осуществлялось на двух равных по количеству группах крыс (экспериментальная и контрольная). Животным опытной группы была выполнена центральная электролитическая центральная миндалевидная резекция. Контрольная группа подверглась ложному "разрушению" центрального отдела миндалины, с последующим недельным восстановительным периодом для обеих групп животных. После полного послеоперационного восстановительного периода все крысы подверглись неинвазивному измерению давления и забору образцов крови. Следующим этапом следовало моделирование стресса внутрибрюшинным введением гидрокортизона. Повторные измерения давления и заборы крови проводились через регулярные промежутки времени. Измерения, сделанные во время экспериментов, и полученные на их основании результаты предполагают, что центральное ядро миндалины в норме активирует тонус симпатической части вегетативной нервной системы, усиливая свое влияние на тонус стенки кровеносных сосудов. Результаты исследования качественного состава крови и показателей гемодинамики показывают, что миндалевидное тело является важным антистрессовым компонентом, на основании того, что у крыс с удаленным центральным ядром миндалины наблюдается более выраженная стрессовая реакция.

Ключевые слова: миндалевидный комплекс, стресс-реакция, сердечно-сосудистая система, амигдалэктомия, крысы.

THE INFLUENCE OF THE CENTRAL AMYGDALA ON THE REGULATION OF HEMODYNAMICS OF RATS AT REST AND IN THE SIMULATION OF GLUCOCORTICOID-INDUCED STRESS

Bakulina E.I.*, Romanova I.D.
Samara University, Samara, Russia
* bakulinae@inbox.ru

Abstract. The phenomenon of stress has been discovered a long time ago, and the process of the stress reaction has been studied in sufficient detail. At the moment, the key neurochemicals (serotonin, corticoliberin) are described and neuroanatomic (amygdala) substrates of affective behavior. However, the nature and mechanism of the effects of the amygdala system on the process of stress reaction implementation remain open. In this paper, we have considered the participation of the central departments of the amygdala complex in hemodynamic reactions against the background of the development of a stress reaction. The study was conducted on rats divided equally into two groups: experimental and control. The animals of the experimental group underwent central electrolytic amygdalectomy. The control group underwent a false "destruction" of the amygdala. Then the animals underwent a recovery period for seven days. After that, each animal was measured by a non-invasive method and blood sampling. Firstly, intraperitoneal administration of hydrocortisone was performed to simulate stress. Secondly, pressure measurements were carried out, and blood sampling was carried out at regular intervals. Measurements made during the experiments suggest that the central nucleus of the amygdala normally activates the tone of the sympathetic part of the autonomic nervous system. Thereby enhances its effect on the tone of the blood vessel wall. The results show that the amygdala is an important anti-stress component. In rats with the central nucleus of the amygdala removed have a more pronounced stress reaction.

Keywords: amygdala, central division, cardiovascular system, amygdalectomy, rats, stress response.

Введение

Современные нейробиологические исследования демонстрируют, что структуры миндалевидного комплеса (МК) играют значительную роль в ответные реакции организма на стресс.

Центральное ядро (Ce) миндалины входит в систему, которая носит называние расширенная миндалина, состоящую из стриатоподобных ГАМК-ергических клеток и содержащую большое

количество кортиколиберина. На основании того, что выше упомянутая структура является одним из звеньев экстрагипоталамической системы кортиколиберина, то она влияет на стресс-зависимое поведение у животных, выполняя первостепенную роль в инициации эмоционально-мотивированного ответа у особей и опосредуя анксиогенные эффекты кортиколиберина [1].

Нейробиологами установлено, что в стрессовых условиях происходит гиперактивация структур МК [2]. В исследованиях Картер с соавторами продемонстрировано, что обширное разрушение миндалины не сильно влияет на адаптацию к действию острого и хронического стресса. Такое поражение не предотвращает быструю активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси при развитии острого стресса, но отсрочивает адаптацию структур гипоталамуса к действию кортикостероидов при хроническом стрессе. Те же авторы указывают, что локальное разрушение Се МК может усугубить острую реакцию организма на стресс и блокировать привыкание структур гипоталамуса к высоким концентрациям кортикостероидов [3].

В исследованиях многих ученых описано что, гормоны стресса (кортикостерон у грызунов, гидрокортизон у приматов и человека) при хроническом действии активируют глюкокортикоидные и минералокортикоидные рецепторы нейронов переднемозговых структур, предопределяя продолжительные нарушения активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, основательное изменение баланса глюкокортикоидов, повреждение нейронов медиальной префронтальной коры, миндалины и гиппокампа. Все выше перечисленные отклонения от нормы приводят к нарушениям краткосрочной памяти, поведенческой гибкости и принятия решений [4, 5].

Таким образом, исходя из изучения обширного объёма литературы имеющейся по данной теме, участие структур МК в формировании стресс-синдрома не подвергается сомнению. Вместе с тем, характер данного участия, а так же его механизмы остаются открытыми, что является перспективной областью исследования.

Материалы и методы

Объект исследования

Работа реализована на 24 половозрелых самках крыс (стадия диэструса). Масса тела особей: 240 - 320 грамм. Животные разделены на две группы (12 особей в каждой): экспериментальная и контрольная. Исследования проводились с соблюдением правил биоэтики.

Центральная электролитическая амигдалэктомия

Операционное вмешательство проводилась под внутрибрюшинным нембуталовым наркозом (70 мг/кг), с использованием стереотаксического прибора по координатам структуры (Paxions, Watson, 1986: P - 1.8 мм, L - 3.8 мм, V – 7.8 мм) в соответствии с атласом мозга крыс. Экспериментальной группе крыс Се МК была разрушена электролитическим методом (анодный ток 0,1 А в течение 10 секунд). Контрольной группе проводилось ложное «разрушение» Се МК, т.е. введение электрода без действия тока. На протяжении последующей недели осуществляются послеоперационные наблюдения за раной – антисептические и асептические мероприятия.

Неинвазивное измерение артериального давления крыс

Измерение кровяного давления крыс проводилось неинвазивным методом с использованием аппарата CODA Monitor. Методика проведения измерений заключается в препятствовании притока крови к хвосту животного за счёт надувании окклюзионой манжеты. При последующем медленном спускании воздуха из манжеты хвостовая манжета (включает в себя датчик VPR) измеряет физиологические характеристики возвращающегося кровотока. В целом CODA Monitor измеряет шесть параметров артериального давления у бодрствующих или анестезированных животных [6]. В эксперименте проводилось регистрация пяти параметров у бодрствующих крыс: систолическое давление (СД), диастолическое давление (ДД), среднее давление (СрД), частота сердечных сокращений (ЧСС), минутный объём крови (МОК), а пульсовое давление (ПД) рассчитывалась по полученным данным. Регистрация данных проводилась несколько раз, а впоследствии рассчитывали моду, учитывая погрешность в измерениях.

Забор крови, составление лейкоцитарной формулы крыс

Мазки подготавливали из нативной крови, фиксируя на предметном стекле смесью этилового спирта и этилового эфира (1:1) и окрашивая по методу Романовского-Гимзы [7]. Исследование мазков производилось под микроскопом (объектив на 90) с иммерсией, с фиксацией клеток на лейкоцитарном счетчике (общий объём 200 клеток) с последующим составлением процентного соотношения различных форм лейкоцитов – лейкоцитарная формула крови крыс.

Имитация стресс-реакции

Для имитации стресса у животных использовался Гидрокортизон Рихтер (Gedeon Richter Plc) - 1 мг на 100 гр веса животного. Гидрокортизон – глюкокортикоидное средство, оказывает противовоспалительное действие и подавляет функции лейкоцитов и

тканевых макрофагов. Препарат метаболизируется преимущественно в печени (T1/2 – 80-120 мин) [8]. Исходя из показателя период полураспада, регистрацию данных проводили спустя полтора часа после введения вещества и спустя 3 часа, можно наглядно наблюдать у каких животных на фоне введенного препарата развивается стресс-реакция, а у каких просто протекает химическая реакция.

Статистическая обработка

Статистическая обработка данных была произведена с помощью программы Sigma Plot 12.5 (SYSTAT Software). Рассчитывались следующие параметры: среднее значение выборок, ошибка среднего, медиана распределения выборки. Для сравнения выборок использовали t-тест и тест Манна – Уитни Существенными считали различия с уровнем значимости $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было выявлено, что у амигдалэктомированных крыс в покое ДД и СрД ниже, чем у животных контрольной группы в том же состоянии. Однако ПД в покое выше в экспериментальной группе (рис. 1).

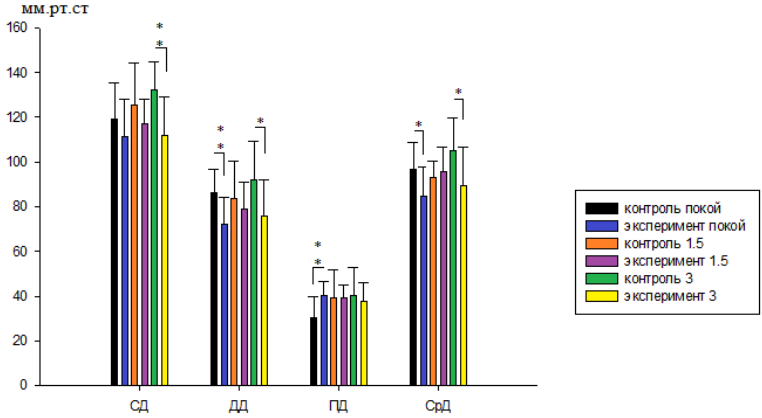


Рис. 1. Значения систолического (СД), диастолического (ДД), пульсового (ПД) и среднего (СрД) давления у крыс в покое и под влиянием гидрокортизона (через полтора (1.5) и три (3) часа после его введения). Условные обозначения:

* - статистически значимые различия между исследуемыми группами ($p<0,05$);

** - статистически значимые различия между исследуемыми группами ($p<0,01$).

При измерении гемодинамических показателей крыс экспериментальной группы при развитии стресса наблюдается снижение большинства из них (СД, ДД и СрД). Динамика показателей СД, ДД и СрД у контрольных животных противоположна экспериментальным, данные показатели возрастают к трем часам после введения гидрокортизона (рис. 1).

Статистически значимых различий в показателях ЧСС и МОК не были получены в ходе данного исследования.

При анализе расчитанных лейкоцитарных формул крови крыс были получены следующие результаты, процентное содержание эозинофилов в крови экспериментальных животных при развитии стресс-реакции резко снижается после введения гидрокортизона и остается на таком уровне, на протяжении трех часов. У контрольной группы так же наблюдается снижение количества эозинофилов, но менее резко и не на столь большие значения, однако исходное их содержание в покое выше, чем к третьему часу эксперимента (рис. 2).

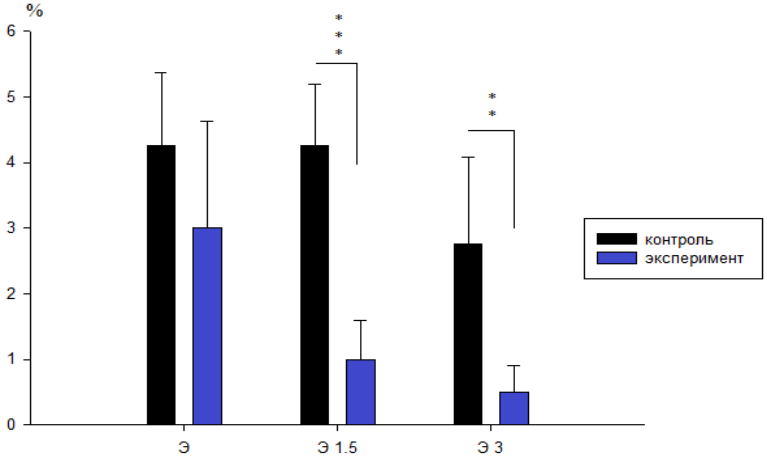


Рис. 2. Процентное соотношение эозинофилов у контрольной и экспериментальной группы крыс в покое и при развитии стресс-реакции. Условные обозначения: ** - статистически значимые различия между исследуемыми группами ($p<0,01$); *** - статистически значимые различия между исследуемыми группами ($p<0,001$); Э – покой; Э 1.5 – полтора часа после введения гидрокортизона; Э 3 – три часа после введения гидрокортизона.

Статистически значимых различий в процентном содержании других форм лейкоцитов не были обнаружены в ходе данного исследования.

Полученные результаты согласуются с данными других авторов по исследуемой теме. Folkow в эксперименте у 6-недельных спонтанно гипертензивных (SHR) крыс проводил двухстороннее разрушение миндалевидного тела, а так же в эксперименте исследовались ложно оперированные SHR крысы. По сравнению с контролем, повышения артериального давления у амигдалоэктамированных крыс не наблюдалось [9].

Sanders с соавторами проводил исследования на самцах пограничных гипертензивных крыс (BHR), проводя двухстороннее электролитическое поражение Се амигдалы и фиктивное центральное амигдалоэктамирование. В результате проводимых прямых измерений артериального давления и ЧСС в покое, им было выяснено, что при поражении центрального ядра происходит достоверное снижение параметров артериального давления и ЧСС [10].

Сходные результаты были получены в нашем эксперименте при оценке различий параметров сердечно-сосудистой системы в покое у животных с разрушенным Се МК и у ложно оперированных крыс. У контрольных крыс в покое выше СД, ДД и СрД, что не противоречит полученным данным в работах Sanders и Folkow.

Так же в работе Sanders на самцах пограничных гипертензивных крыс (BHR) проводилась регистрация артериального давления и ЧСС в течение 10 мин острого стресса и в течение 10 мин после него. Анализ полученных данных показал, что при поражении Се МК наблюдалось достоверное ослабление стресс-реакции по сравнению с крысами, с сохранным центральным ядром [10].

В наших исследованиях при модулировании стресса введением гидрокортизона нами получены дынные о возрастании параметров сердечно-сосудистой системы (СС, ДД, ПД и СрД) к третьему часу после введения гидрокортизона у контрольной группы животных и снижение у экспериментальной группы. Полученные данные подтверждаются не только работами Sanders и Kapp, но и работами Zhang с соавторами [11] и Galeno с соавторами в своей статье описывает, что при двустороннем поражение центрального миндалевидного ядра у спонтанно гипертензивных (SHR) и Вистар-Киото (wky) крыс снижается сердечно-сосудистая реакция на острый шумовой стресс [12].

Полученные результаты в ходе нашего исследования в большинстве аспектов согласуются с данными других исследователей, свидетельствующими о вовлечении Се в выражение эмоциональных реакций, включая сопутствующие сердечно-сосудистые изменения. И предположение, что преобладающее влияние Се на сердечно-сосудистый контроль лежит на кровяном давлении, а не на регуляции сердечного ритма. Некоторые же различия между данными полученными нами и предыдущими исследователями, можно объяснить тем, что в их экспериментах крысы изначально были больны или склонны к сердечно-сосудистым заболеваниям.

При модулировании стресса в контроле зарегистрировано системное возрастание СД, а так же возрастание и незначительное снижение ДД к третьему часу экспозиции. Соответственно мы наблюдали сохранение стресс-реакции у контрольных крыс. Введением препарата мы запустили данный процесс, на фоне чего формируются механизмы стресс-реализации. В то время как у экспериментальных крыс мы наблюдаем резкое возрастание и снижение этих же параметров к третьему часу эксперимента. Что на наш взгляд обусловлено метаболизмом гидрокортизона.

При анализе лейкоцитарной формуле значимые изменения были зафиксированы только в процентном соотношении эозинофилов. Их содержание в крови экспериментальных животных снижается после введения гидрокортизона и остается практически неизменным на протяжении трех часов. У контрольной группы так же наблюдается снижение количества эозинофилов, но менее выраженное. Что демонстрирует, что у крыс с удаленным ядром миндалины стресс–реакция на введение гидрокортизона выражена ярче.

При проведении эксперимента все этические правила при работе и содержанию животных были соблюдены в соответствии с биоэтическими нормами и действовали в рамках Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, заключённой 18 марта 1986 г. в Страсбурге и одобрены комиссией по биоэтике Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева (протокол № 3 от 20 июня 2020 года).

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Литература

1. Шабанов П. Д., Лебедев А.А. Структурно-функциональная организация системы расширенной миндалины и ее роль в подкреплении // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2007. Т. 5. №1. С. 2–16.
2. Hölzel B. K., Newman M., Carmody J. et all. Stress reduction correlates with structural changes in the amygdale // Social Cognitive and Affective Neuroscience. 2010. Vol. 5(1). Pp. 11–17.
3. Carter R. N., Pinnock S. B., Herbert J. Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress? // Neuroscience. 2004. Vol. 126. Pp. 9–19.
4. Dimitrov A., Demin K., Fehlner P. et all. Differences in Neural Recovery From Acute Stress Between Cortisol Responders and Non-responders // Front Psychiatry. 2018. Vol. 9. 13 p..
5. Moulton E., Chamness M., Knox D. Characterizing changes in glucocorticoid receptor internalization in the fear circuit in an animal model of post traumatic stress disorder // PLoS One. 2018. Vol. 13(12). 14 p..
6. CODA User's Guide. URL: https://www.kentscientific.com/Customer-Content/www/products/Files/CODA-Monitor-Users-Guide-v1_0.pdf
7. Практикум по клинической диагностике с рентгенологией: учебное пособие / Е. С. Воронин, С. П. Ковалев, Г. В. Сноз, В. И. Черкасова, А. М. Шабанов, М. В. Щукин. М.: Инфра-м, 2014. 336 с.
8. Гидрокортизон-Рихтер (Hydrocortisone-Richter) инструкция по применению. URL: https://www.vidal.ru/drugs/hydrocortisone-richter__2028
9. Folkow B., Hallback-Nordlander M., Martnev J., Nordborg C. Influence of amygdala lesions on cardiovascular responses to altering stimuli on behaviour and on blood pressure development in spontaneously hypertensive rats // Acta Physiol. Scand. 1982. Vol. 116. Pp. 133–140.
10. Sanders B. J., Wirtz-Nole C., DeFord S. M., Erling B. F. Central amygdaloid lesions attenuate cardiovascular responses to acute stress in rats with borderline hypertension // Physiol. Behav. 1994. Vol. 56. No. 4. Pp. 709–713.
11. Zhang J. X., Harper R. M., Ni H. F. Cryogenic blockade of the central nucleus of the amygdala attenuates aversively conditioned blood pressure and respiratory responses // Brain Res. 1986. Vol. 386. Pp. 136–145.
12. Galeno T. M., Van Hoesen G. W., Brody M. J. Central amygdaloid nucleus lesion attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise stress in the spontaneously hypertensive rat // Brain Res. 1984. Vol. 2. Pp. 249–259.

© Бакулина Е.И., Романова И.Д., 2022

УДК: 612.822:567.34

DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.3

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ИНСУЛИНА СНИЖАЕТ АУТОФАГИЧЕСКУЮ, АПОПТОТИЧЕСКУЮ И ОБЩУЮ ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА КРЫС И РЕПЕРФУЗИИ, ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

© Баюнова Л.В.*, Захарова И.О., Илясов И.О., Аврова Д.К., Фокина Е.А, Аврова Н.Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия

* bayunoval@mail.ru

Аннотация. Инсулин является одним из наиболее перспективных нейропротекторов для лечения болезней, связанных с поражением мозга. Но при ишемическом поражении мозга защитный эффект интраназального введения инсулина практически не изучен (в отличие от эффектов IGF-1), хотя инсульт мозга является одной из основных причин тяжелой инвалидности и смерти людей в мире. В настоящее время ясна важность изучения действия нейропротекторов на аутофагическую гибель нейронов при поражениях мозга. Нами изучено влияние двухсосудистой ишемии и последующей реперфузии переднего мозга крыс и инсулина на жизнеспособность нейронов мозга при окраске толуидиновым синим. Показано, что после десятиминутной ишемии на 7 сутки реперфузии наблюдается снижение числа нейронов на единицу площади в районе CA1 гиппокампа и в коре лобной доли мозга крыс. Найдено достоверное уменьшение числа погибших нейронов мозга при интрацеребровентрикулярном введении ингибитора аутофагии 3-метиладенина или ингибитора апоптоза Ac-DEVD-CHO по сравнению с результатами, полученными при введении крысам буфера. Эти данные показали, что аутофагия и апоптоз относятся к основным причинам гибели нейронов в наших опытах при ишемии и реперфузии мозга. Введение крысам 0.5 МЕ инсулина интраназально за 1 час до ишемии и затем 7 дней ежедневно при реперфузии приводило к достоверному уменьшению числа погибших от аутофагии и апоптоза нейронов в CA1 районе гиппокампа и коре лобной доли мозга. Выявлено увеличение маркеров аутофагии LC3-

II/LC3-1 и Beclin-1 и маркера апоптоза - фрагмента каспазы-3 (17-19 kDa) - в гиппокампе под влиянием ишемии и реперфузии и их снижение при введении крысам инсулина. Показано, что инсулин повышает жизнеспособность нейронов коры мозга в культуре в условиях окислительного стресса. Его защитный эффект связан, в частности, с активацией протеинкиназы Akt, ингибированием AMPK-alpha и инактивацией GSK-3beta, а также с нормализацией отношения Bax/Bcl-2. При этом активация Akt и инактивация AMPK-alpha способствуют подавлению аутофагии, а инактивация GSK-3beta и нормализация отношения Bax/Bcl-2 вызывают уменьшение апоптотической гибели нейронов. По-видимому, модуляция активности этих протеинкиназ инсулином и уменьшение им отношения Bax/Bcl-2 в большой мере определяет его способность снижать гибель нейронов от активации аутофагии и апоптотоза при глобальной ишемии и реперфузии переднего мозга крыс.

Ключевые слова: глобальная ишемия; аутофагическая и апоптотическая гибель нейронов; интраназальный инсулин; протеинкиназы; соотношение Bax/Bcl-2.

INTRANASAL INSULIN ADMINISTRATION REDUCES AUTOPHAGIC, APOPTOTIC AND TOTAL NEURONAL DEATH IN GLOBAL RAT FOREBRAIN ISCHEMIA AND REPERFUSION, A POSSIBLE MECHANISM OF INSULIN ACTION

© Bayunova L.V.*, Zakharova I.O., Ilyasov I.O., Avrova D.K., Fokina E.A., Avrova N.F.

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

* bayunoval@mail.ru

Abstract. Insulin is one of the most promising neuroprotective agents for the treatment of diseases associated with brain damage. However, in ischemic brain injuries, the protective effect of intranasal insulin administration was practically not studied (in contrast to the effects of IGF-1), although cerebral stroke is one of the main causes of severe disability and death of the people in the world. At present, the importance of studying the effect of neuroprotectors on autophagic neuronal death in brain lesions is clear. We have studied the effect of double-vessel ischemia and subsequent reperfusion of the rat forebrain and of insulin on the viability of brain neurons when stained with toluidine blue. It was shown that after a ten-minute ischemia on the 7th day of reperfusion, a decrease in the number

of neurons per unit area was observed in the CA1 region of the hippocampus and in the cortex of the frontal lobe of the rat brain. A significant decrease in the number of dead brain neurons was shown after intracerebroventricular administration of the autophagy inhibitor 3-methyladenine or the apoptosis inhibitor Ac-DEVD-CHO, as compared with the results obtained with buffer administration to rats. These data showed that autophagy and apoptosis were the main causes of neuronal death in brain ischemia and reperfusion in our experiments. Intranasal administration of 0.5 IU of insulin to rats 1 hour before ischemia and then daily during reperfusion for 7 days led to a significant decrease in the number of neurons dying from autophagy and apoptosis in the CA1 region of the hippocampus and in the cortex of brain frontal lobe. An increase in autophagy markers LC3-II/LC3-1 and Beclin-1 and a marker of apoptosis - a fragment of caspase-3 (17-19 kDa) - in the hippocampus under the influence of ischemia and reperfusion and their decrease in the case of insulin administration to rats were revealed. It was shown that insulin increased the viability of brain cortical neurons in culture in conditions of oxidative stress. Its protective effect is associated, in particular, with the activation of Akt protein kinase, the inhibition of AMPK-alpha, the inactivation of GSK-3beta and the normalization of the Bax/Bcl-2 ratio. At the same time, activation of Akt and inactivation of AMPK-alpha contribute to the suppression of autophagy, while inactivation of GSK-3beta and decrease of Bax/Bcl-2 ratio diminish the apoptotic death of neurons. Apparently, the modulation of the activities of these protein kinases and normalization of Bax/Bcl-2 ratio by insulin largely determines its ability to reduce neuronal death from autophagy and apoptosis activation during global ischemia and reperfusion of the rat forebrain.

Keywords: global ischemia; autophagic and apoptotic neuronal death; intranasal insulin; protein kinases; Bax/Bcl-2 ratio.

Введение

Инсульт мозга является одной из основных причин тяжелой инвалидности и смерти людей в мире. В настоящее время стало ясно, что невозможно достичь понимания нарушений в мозге при ишемии и реперфузии и оценить действие на них нейропротекторов без исследования аутофагической гибели нейронов. При этом аутофагии принадлежит ключевая роль в поддержании клеточного гомеостаза. Но в настоящее время представления об исключительно защитной роли аутофагии пересмотрены. Во многих работах показано, что подавление аутофагической гибели нейронов способствует их лучшей сохранности при ишемических и других поражениях мозга. В настоящее время

считают, что сигнальные молекулы и внутриклеточные каскады, ответственные за регуляцию аутофагии, могут стать одной из терапевтических мишеней при лечении инсульта головного мозга и других форм его ишемического поражения [1, 2].

Инсулин является одним из наиболее перспективных нейропротекторов для лечения болезней, связанных с поражением мозга. Но при ишемическом поражении мозга защитный эффект интраназального введения инсулина (повышающего его уровень в ЦНС) практически не изучен (в отличие от эффектов IGF-1). Не изучена и способность инсулина модулировать процессы аутофагии при ишемии мозга и последующей реперфузии. При этом для многих других нейропротекторов показано, что ингибирование ими процессов аутофагии при ишемии и реперфузии мозга способствует нормализации метаболизма в мозге и улучшению состояния животных [3, 4].

Основной целью исследования является изучение способности инсулина при его интраназальном введении снижать аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов мозга крыс при двухсосудистой ишемии переднего мозга и последующей реперфузии, для понимания возможного механизма этих эффектов инсулина интерес представляют данные о модуляции инсулином ряда протеинкиназ, полученные нами на первичной культуре нейронов коры мозга.

Материалы и методы

Интраназальное введение инсулина. Инсулин (Sigma, США) самцам крыс линии Вистар массой 270-330 г вводили интраназально (0,5 МЕ/крысу) за 1 ч до операции и затем 3 или 7 дней ежедневно (при реперфузии) в виде раствора, приготовленного на цитратном буфере (pH 4,4).

Операция по введению ингибиторов апоптоза и аутофагии в боковой (I) желудочек мозга крыс. Операцию проводили на самцах крыс линии Вистар, наркотизированных хлоралгидратом (Sigma, США) внутримышечно в дозе 400 мг/кг. Использовали стереотаксис и стоматологический бор для трепанации черепа крыс в области, расположенной над I желудочком мозга (координаты: AP= -0.92 мм, L=1.5мм, V=3.5 мм относительно брегмы) в соответствии со стереотаксическим атласом [5]. 20 мкг 3-метиладенина (Merck, Германия) и 10 мкг Ac-DEVD-CHO (BD Biosciences, США) вводились в виде растворов объёмом 4.5 мкл с помощью шприца (Hamilton, США).

Двухсосудистая ишемия переднего мозга крыс. Двухсосудистую ишемию переднего мозга проводили у самцов после операции по введению ингибиторов в боковой желудочек мозга путем пережатия каротидных артерий на 10 мин в сочетании с гипотензией (снижением артериального давления до 40 мм ртутного столба). Затем каротидные артерии разжимали и возвращали в кровяное русло кровь с гепарином, отобранную шприцом на стадии ишемии, как описано ранее [6]. Ложнооперированных крыс использовали в качестве контрольных животных. Животным после завершения ишемии обрабатывали раны стрептоцидом и накладывали швы. Послеоперационный уход за животными осуществлялся в течение 7 дней при содержании на стандартном рационе. Наркотизированных хлоралгидратом крыс декапитировали, извлекали мозг, промывали охлажденным физиологическим раствором и помещали на 5 дней в раствор 4%-ного параформальдегида (+4°C). Для криопротекции мозг выдерживали в растворе 30%-ной сахарозы 7 дней при +4 ^{o}C, после этого замораживали в изопентане и далее хранили при -80°C. Из области фронтальной коры и гиппокампа получали чередующиеся серии фронтальных срезов (10 мкм) с помощью криостата (Leika, Германия). Каждый 10-й срез монтировали на покрытые желатином стекла (БиоВитрум, Россия). Для оценки количества живых нейронов проводили окрашивание толуидиновым синим по модифицированному методу Ниссля.

Первичная культура нейронов коры мозга. Нейроны выделяли из коры мозга эмбрионов крыс линии Вистар на 17-18-й дни развития, как это описано ранее [7]. Суспензию клеток высеивали по 5 х 10^5 в каждую лунку в 24-луночные планшеты, покрытые поли-d-лизином (Sigma, США), в среде Neurobasal medium (Gibco, Великобритания) с 2% ростовой добавкой B-27 (Gibco, Великобритания). Опыты *in vitro* начинали на 6-7-й дни культивирования клеток в этой среде. Клетки промывали фосфатным буфером, переводили в среду Neurobasal medium, содержащую 1% ростовой добавки B 27 без инсулина. Преинкубацию нейронов коры мозга с 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ или 1 мкМ инсулином проводили в течение 1 ч. После этого нейроны коры мозга подвергали действию 100 мкМ перекиси водорода (ПВ, H_2O_2) (Sigma, США) в течение 6 ч.

Определение жизнеспособности нейронов коры мозга в культуре. Оценку жизнеспособности нейронов коры мозга проводили, используя колориметрический метод, который базируется на способности митохондрий жизнеспособных клеток восстанавливать 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ,

Sigma, США) в окрашенный МТТ-формазан, его экстинкцию измеряли при λ=595 нм и выражали в процентах от контроля [6].

Оценка влияния инсулина и перекиси водорода на активность Akt, GSK-3beta и AMPK и экспрессию этих протеинкиназ, а также Bax, Bcl-2 с использованием вестерн-блоттинга. После инкубации со 100 нМ или 1 мкМ инсулином (или без него) в течение 1 ч и затем с 100 мкМ H_2O_2 в течение 6 ч нейроны коры головного мозга промывали охлажденным фосфатным буферным раствором (PBS) и лизировали в 60 мкл лизирующего буфера. Лизис нейронов коры и определение концентрации белков проводили, как описано ранее [7]. В каждую дорожку загружали эквивалентные количества лизатов (20-25 мкг белка), подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле, после чего осуществляли их перенос на нитроцеллюлозные мембраны Protran 0,45 мкм (Amersham, GE Healthcare, Великобритания). Сайты неспецифического связывания мембран блокировали, как описано ранее [7]. Мембраны инкубировали с антителами, специфичными к pAkt (Ser^{473}), к pGSK-3beta (Ser^{9}), к pAMPK-альфа (Thr^{172}) и к Bcl-2 и Bax (1:1000, Cell Signaling Technology, США), как описано ранее [7, 8]. В качестве вторичных антител использовались антимышиные или антикроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cell Signaling Technology, США). Сигнал пероксидазы хрена усиливали с помощью реагентов Novex ECL HRP Reagent Kit (Invitrogen, США). Для нормализации данных мембраны после стриппинга инкубировали с антителами к суммарной форме протеинкиназ Akt, GSK-3beta, AMPK-альфа или GAPDH. Данные представляли в виде соотношения pAkt (Ser^{473})/Akt, pGSK-3beta (Ser^{9})/GSK-3beta, pAMPK-альфа (Thr^{172})/AMPK-альфа, Bax/альфа-тубулин, Bcl-2/альфа-тубулин и принимали как 1,0 в контрольных клетках. Также рассчитывали соотношение Bax/Bcl-2, которое в контрольных клетках принималось за 100%. Пленки с сигналом хемилюминесценции сканировались на сканере Canon (CanoScan 8800F). Для количественного определения оптической плотности положительных полос использовали программу Bio7.

Статистическая обработка данных. Данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего (SEM). Статистическую достоверность различий, если речь идет о трех и более группах данных, определяли методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием Tukey's теста для множественных сравнений, а сравнение двух групп данных проводили с применением парного *t*-критерия Стьюдента, используя Prizm 7.0. Достоверными различия считали при $p<0.05$.

Результаты и обсуждение

Интраназальный инсулин в настоящее время считается одним из самых перспективных нейропротекторов.

Опыты по применению инсулина как нейропротектора на различных моделях болезни Альцгеймера и Паркинсона у животных являются успешными. Проведен также ряд клинических испытаний интраназального введения инсулина людям при болезни Альцгеймера [9, 10], а также Паркинсона [11]. Они показали, что интраназальный инсулин улучшает у пациентов вербальную память и некоторые показатели повседневной активности. Однако, как указывалось во «Введении», существует пробел в наших знаниях о способности интраназально вводимого инсулина оказывать нейропротекторный эффект при ишемии и реперфузии мозга, нет данных о влиянии инсулина на аутофагическую гибель нейронов. При этом работы в отношении защитных эффектов введения IGF-1 не восполняют отсутствие данных о действии инсулина, в связи с тем, что инсулин, очевидно, является более адекватным протектором, как кандидат для применения в клинической практике [12].

Глобальная ишемия переднего мозга крыс и реперфузия вызывают гибель нейронов, а интраназальное введение инсулина снижает апоптотическую и аутофагическую.гибель нейронов в CA1 районе гиппокампа и коре лобной доли мозга.

Мы подвергали крыс десятиминутной двухсосудистой ишемии в сочетании с гипотензией и последующей реперфузии. Показано, что на 7 сутки реперфузии наблюдается снижение числа нейронов на единицу площади в районе CA1 гиппокампа и в коре лобной доли мозга крыс. Для того, чтобы выявить аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов в этих районах мозга крыс, нами применялось интрацеребровентрикулярное введении ингибитора аутофагии 3-метиладенина и ингибитора апоптоза Ac-DEVD-CHO. В качестве контрольных использовали крыс, которым вводили в желудочки мозга буфер вместо ингибиторов. В каждом из трех поставленных опытов (на основании изучения 8-10 параллельных определений) нами показано достоверное уменьшение числа погибших нейронов мозга при введении крысам 3-метиладенина или Ac-DEVD-CHO по сравнению с данными, полученными в отсутствие ингибитора. Эти данные свидетельствуют о том, что аутофагическая и апопотическая гибель нейронов мозга относятся к основным причинам их гибели при глобальной ишемии переднего мозга и последующей реперфузии. При изучении защитного эффекта инсулина его вводили крысам в дозе 0.5 МЕ интраназально за 1 час до ишемии и затем 7 дней

ежедневно при реперфузии. Это приводило к достоверному уменьшению суммарного числа погибших нейронов в CA1 районе гиппокампа и в коре лобной доли, а также числа нейронов, погибших от аутофагии и апоптоза в этих структурах мозга.

Глобальная ишемия переднего мозга крыс и реперфузия увеличивают экспрессию маркеров аутофагии в гиппокампе крыс, а интраназальное введение инсулина снижает её.

Выявлено увеличение маркеров аутофагии LC3-II/LC3-1 и Beclin-1 и маркера апоптоза, представляющего собой фрагмент каспазы-3 (17-19 kDa), в гиппокампе крыс под влиянием ишемии и реперфузии переднего мозга и их снижение при интраназальном введении крысам инсулина. В этих опытах инсулин вводился за 1 час в дозе 0.5 МЕ до десятиминутного ишемического воздействия на мозг крыс в сочетании с гипотензией и затем ежедневно в течение трехдневного воздействия реперфузии. В этой серии опытов крыс забивали на 3 сутки. Полученные данные показывают, что ишемия и реперфузия активизируют процессы аутофагии и апоптоза в гиппокампе крыс, а введение инсулина, напротив, их подавляет. Таким образом, найдено, что инсулин относится к тем нейропротекторам, которые повышают жизнеспособность нейронов в мозге, подвергнутом действию ишемии и реперфузии, благодаря ингибированию не только апоптоза, но и аутофагии, активация которых приводит к гибели нейронов. К таким нейропротекторам относятся многие флавоноиды, пропофол, N-ацетил-серотонин, ганглиозид GM1 и ряд других соединений [3, 4, 13, 14, 15].

Инсулин повышает жизнеспособность нейронов коры мозга крыс, подвергшихся воздействию H_2O_2.

Установлено, что защитный эффект инсулина зависит от его концентрации в наномолярном диапазоне (1 нМ < 10 нМ < 100 нМ или 1 мкМ инсулина) (рис. 1).

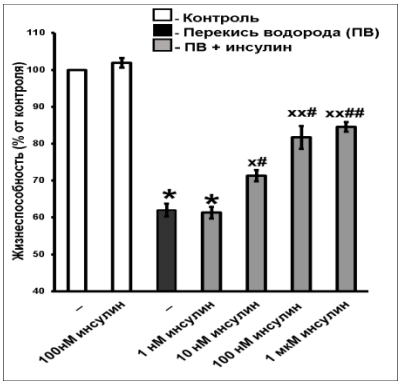


Рис. 1. Влияние инсулина и H_2O_2 на жизнеспособность нейронов коры мозга. Результаты одного типичного эксперимента (в серии из 5 опытов) представлены как среднее ± SEM для 3 параллельных определений. Различия достоверны согласно ANOVA по сравнению: * - с контролем, ^{x} - с действием только H_2O_2, $^{\#}$ - с действием 1 нМ инсулина и H_2O_2, $^{\#\#}$ - с действием 10 нМ инсулина и H_2O_2, $p<0{,}01$ во всех случаях.

Инсулин активирует Akt и инактивирует pGSK-3beta в нейронах коры мозга при действии H_2O_2 и в контрольных нейронах.

Активность инсулин-индуцированной протеинкиназы B (Akt) оценивали, измеряя уровень Akt, фосфорилированной по Ser^{473}.

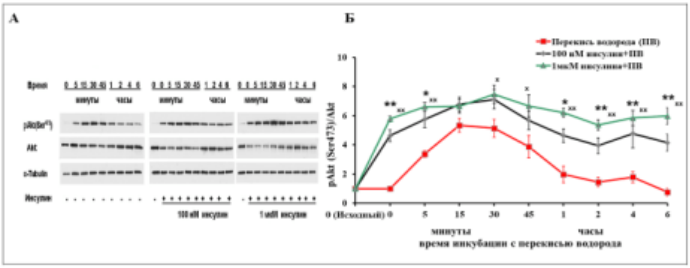


Рис. 2. Инсулин повышает уровень pAkt (Ser^{473}) в нейронах коры мозга при действии H_2O_2. А – иммуноблоты, полученные в типичном опыте. Б - результаты 5 опытов представлены как среднее ± SEM. Линии с квадратами показывают действие только H_2O_2, линии с ромбами – действие H_2O_2 после инкубации нейронов со 100 нМ инсулина, линии с

треугольниками – действие H_2O_2 после инкубации нейронов с 1 мкМ инсулина. Различия достоверны согласно парному t-критерию Стьюдента по сравнению с эффектом одной H_2O_2: * и ** – эффект преинкубации со 100 нМ инсулином достоверен, * - $p<0,05$, ** - $p < 0,02$; ^{x} и ^{xx} - эффект преинкубации с 1 мкМ инсулином достоверен, ^{x} - $p<0,05$, ^{xx} - $p< 0,02$.

Наши данные об активации Akt согласуются с данными других авторов [16, 17]. H_2O_2 сама по себе активирует Akt. Инсулин повышает активность Akt в нейронах (по сравнению с действием только H_2O_2) с 5 мин до 6 ч после аппликации прооксиданта. При этом инсулин способен активировать Akt через 1-6 ч после воздействия H_2O_2 на нейроны, когда активирующий эффект прооксиданта уже отсутствует (рис. 2 А и Б).

Активация Akt инсулином приводит к увеличению уровня pGSK-3beta (Ser^9) в нейронах и к инактивации этой протеинкиназы. Как видно из рис. 3 А и Б, 100 нМ и 1 мкМ инсулин повышает уровень pGSK 3-бета (Ser^9) и таким образом инактивирует этот фермент. Эти результаты не согласуются с данными Дуарте и соавторов [17], которые не выявили увеличения pGSK-3beta (Ser^9) в нейронах коры мозга под влиянием инсулина и предполагают иной путь инактивации фермента инсулином. По-видимому, это связано с тем, что они определяли эффект инсулина лишь на одном временном отрезке, а не в динамике развития окислительного стресса, как в наших опытах. В то же время наши результаты согласуются с данными об инсулин-индуцированном повышении уровня pGSK 3-бета (Ser^9), приводящем к инактивации фермента в опытах *in vivo* [18], и с данными ряда других авторов об инсулин-индуцированном повышении уровня pGSK 3-бета (Ser^9).

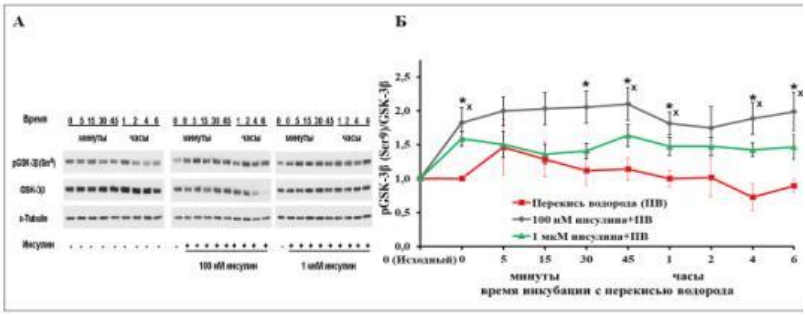


Рис. 3. Инсулин вызывает повышение уровня pGSK 3-бета (Ser^9) в нейронах коры мозга, подвергшихся воздействию H_2O_2. А – иммуноблоты, полученные в типичном опыте. Б - результаты 7 опытов представлены как среднее ± SEM. Различия достоверны согласно парному *t*-критерию Стьюдента по сравнению с эффектом одной H_2O_2: * - эффект преинкубации со 100 нМ инсулином достоверен, $p<0,05$; ^{x} - эффект преинкубации с 1 мкМ инсулином достоверен, $p<0,05$.

Инсулин нормализует соотношение про- и антиапоптотических белков (Bax/Bcl-2) в нейронах коры мозга, повышенное при воздействии на эти клетки H_2O_2.

Соотношение Bax/Bcl-2 достоверно повышалось на 41-64% в нейронах коры в различные сроки после воздействия H_2O_2. В то же время преинкубация со 100 нМ и 1 мкМ инсулином нормализует это соотношение в нейронах и делает его близким к соотношению Bax/Bcl-2 в контрольных клетках (рис. 4).

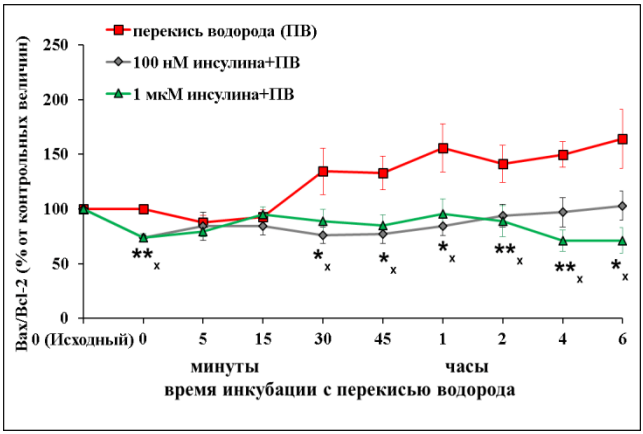


Рис. 4. Инсулин нормализует соотношение Bax/Bcl-2 в нейронах коры мозга, заметно повышенное при воздействии на них H_2O_2.
Данные представлены как среднее ± SEM из 9 проведенных экспериментов. Различия достоверны согласно парному *t*-критерию Стьюдента по сравнению с эффектом одной H_2O_2: * и ** – эффект преинкубации со 100 нМ инсулином достоверен, * - $p<0,05$, ** - $p < 0,01$; ^{x} - эффект преинкубации с 1 мкМ инсулином достоверен, ^{x} - $p<0,02$.

Инсулин ингибирует активность AMPK в нейронах коры мозга, увеличенную при воздействии H_2O_2.

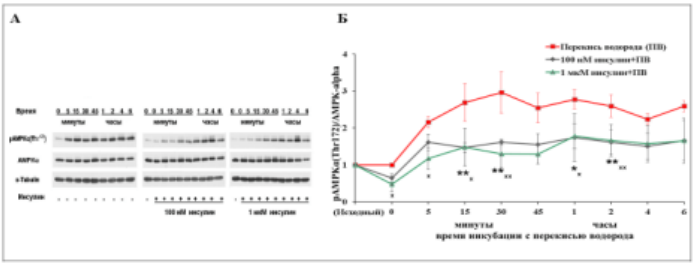


Рис. 5. Инсулин снижает уровень pAMPKalpha (Thr^{172}), повышенный в нейронах коры мозга при воздействии на них H_2O_2.
А – иммуноблоты, полученные в типичном опыте. Б – результаты 7 опытов представлены как среднее ± SEM. Различия достоверны согласно парному *t*-критерию Стьюдента по сравнению с эффектом

одной H_2O_2: * и ** – эффект преинкубации со 100 нМ инсулином достоверен, * - $p<0,05$, ** - $p < 0,02$; ^{x} и ^{xx} - эффект преинкубации с 1 мкМ инсулином достоверен, ^{x} - $p<0,05$, ^{xx} - $p< 0,02$.

AMPK участвует как в нейропротекции, так и в нейродегенерации. Активация AMPK характерна для различных стрессов, в том числе для окислительного стресса, она связана с истощением АТФ и накоплением АМФ и АДФ в различных клетках [19, 20]. В наших опытах H_2O_2 активировала AMPK по сравнению с её уровнем в контроле, тогда как предварительная инкубация нейронов со 100 нМ и 1 мкМ инсулином приводила к значительному уменьшению уровня активности фермента, о чем судили по степени фосфорилирования AMPK по Thr^{172} (рис. 5 А и Б). Наши результаты согласуются с данными об ингибировании инсулином AMPK в экстраневральных органах и клетках [21].

Заключение

Найдено, что после десятиминутной двухсосудистой ишемии и гипотензии переднего мозга крыс на 7 сутки реперфузии наблюдается снижение числа нейронов на единицу площади в районе CA1 гиппокампа и в коре лобной доли мозга. Показано достоверное уменьшение числа погибших нейронов мозга при интрацеребровентрикулярном введении ингибитора аутофагии 3-метиладенина или ингибитора апоптоза Ac-DEVD-CHO по сравнению с результатами, полученными при введении буфера. Введение крысам 0.5 МЕ инсулина интраназально за 1 час до ишемии и затем 7 дней ежедневно при реперфузии приводило к достоверному уменьшению числа погибших от аутофагии и апоптоза нейронов в CA1 районе гиппокампа и в коре лобной доли мозга. Выявлено увеличение уровня маркеров аутофагии LC3-II/LC3-1 и Beclin-1 и маркера апоптоза - фрагмента каспазы-3 (17-19 kDa) - в гиппокампе под влиянием ишемии и реперфузии и их снижение при введении крысам инсулина. Эти данные показали, что аутофагия и апоптоз относятся к основным причинам гибели нейронов в наших опытах при ишемии и реперфузии мозга, а инсулин при его интраназальном введении способен значительно уменьшать гибель нейронов коры мозга по этим причинам.

Нами найдено, что инсулин ингибирует AMPK в нейронах коры мозга в культуре в условиях окислительного стресса, тогда как активация этого фермента способствует запуску или усилению процессов аутофагии. В то же время инсулин, согласно нашим и

литературным данным, активирует Akt, которая, как известно, способна ингибировать процессы аутофагии. При этом инсулин-индуцированная инактивация GSK 3-бета при фосфорилировании фермента по Ser^9 протеинкиназой Akt и нормализация соотношения про- и антиапоптотических белков (Bax/Bcl-2), осуществляемая этим протектором, очевидно, опосредуют антиапоптотический эффект инсулина на нейроны коры мозга в условиях окислительного стресса. По-видимому, эти эффекты инсулина на сигнальные системы нейронов лежат в основе его способности ингибировать процессы аутофагии и апоптоза в нервной ткани.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 25-22-0415).

При работе с животными соблюдали все международные биоэтические нормы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Lu G., Wang Y., Shi Y., Zhang Z., Huang C., He W., Wang C., Shen H. M. Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target // Med. Comm. 2022. Vol. 3 No 3. e150. doi: 10.1002/mco2.150.
2. Nabavi S. F., Sureda A., Sanches-Silva A., Pandima D. K., Ahmed T., Shahid M., Sobarzo-Sánchez E., Dacrema M., Daglia M., Braidy N., Vacca R. A., Berindan-Neagoe I., Gulei D., Barreca D., Banach M., Nabavi S. M., Dehpour A. R., Shirooie S. Novel therapeutic strategies for stroke: The role of autophagy // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2019. Vol. 56. No 3. Pp. 182-199. doi: 10.1080/10408363.2019.1575333.
3. Zhou H., Wang J., Jiang J., Stavrovskaya I. G., Li M., Li W., Wu Q., Zhang X., Luo C., Zhou S., Sirianni A. C., Sarkar S., Kristal B. S., Friedlander R. M., Wang X. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury // J Neurosci. 2014. Vol. 34. No 8. Pp.2967-2978. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1948-13.2014.
4. Li L., Pan G., Fan R., Li D., Guo L., Ma L., Liang H., Qiu J. Luteolin alleviates inflammation and autophagy of hippocampus induced by cerebral ischemia/reperfusion by activating PPAR gamma in rats // BMC Complement Med. Ther. 2022. Vol. 22. No 1. P. 176. doi: 10.1186/s12906-022-03652-8.
5. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth Edition. International standard book number: 0-12-547617-5. Acad. Press. 1998. San Diego, Calif., USA.

6. Zorina I. I., Bayunova L. V., Zakharova I. O., Avrova N. F. The dependence of the protective effect of insulin on its concentration and modulation of ERK1/2 activity under the conditions of oxidative stress in cortical neurons // Neurochem. J. 2018. Vol. 12. Pp. 111-116. doi:10.1134/s1819712417040110.
7. Захарова И. О., Соколова Т. В., Зорина И. И., Баюнова Л. В., Рычкова М. П., Аврова Н. Ф. Защитный и антиоксидантный эффекты инсулина на нейроны мозга крыс при окислительном стрессе, их зависимость от модуляции активности протеинкиназы B (Akt) // Ж. эвол. биохим. физиол. 2018. Т. 54. № 3. С. 169-179. doi:10.1134/S0022093018030043.
8. Bayunova L. V., Zorina I. I., Zakharova I. O., Avrova N. F. Insulin increases viability of neurons of rat cerebral cortex and normalizes Bax/Bcl-2 ratio under conditions of oxidative stress // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. Vol. 165, No 1. Pp. 14-17. doi: 10.1007/s10517-018-4088-8.
9. Craft S., Claxton A., Baker L. D., Hanson A. J., Collerton B., Trittschuh E. H., Dahl D., Caulder E., Neth B., Montine T. J., Jung Y., Maldjian J., Whitlow C., Friedman S. Effects of regular and long-acting insulin on cognition and Alzheimer's disease biomarkers: A pilot clinical trial // J. Alzheimers Dis. 2017. Vol. 57. Pp. 1325-1334. doi:10.3233/JAD-161256.
10. Avgerinos K .I., Kalaitzidis G., Malli A., Kalaitzoglou D., Myserlis P. G., Lioutas V.-A. Intranasal insulin in Alzheimer’s dementia or mild cognitive impairment. A systematic review // J. Neurol. 2018. Vol. 265. Pp. 1497–1510. doi:10.1007/s00415-018-8768-0.
11. Novak P., Maldonado D. A. P., Novak V. Safety and preliminary efficacy of intranasal insulin for cognitive impairment in Parkinson disease and multiple system atrophy: A double-blinded placebo-controlled pilot study // PLoS One. 2019. Vol. 14. e0214364, doi:10.1371/journal.pone.0214364.
12. Lioutas V. A., Alfaro-Martinez F., Bedoya F., Chung C. C., Pimentel D. A., Novak V. Intranasal insulin and insulin-like growth factor-1 as neuroprotectants in acute ischemic stroke // Transl. Stroke Res. 2015. Vol. 6. Pp. 264-275. doi:10.1007/s12975-015-0409-7.
13. Cui D., Wang L., Qi A., Zhou Q., Zhang X., Jiang W. Propofol prevents autophagic cell death following oxygen and glucose deprivation in PC12 cells and cerebral ischemia-reperfusion injury in rats // PLoS One. 2012. Vol. 7. No 4. e35324. doi: 10.1371/journal.pone.0035324.
14. Li L., Tian J., Long M. K., Chen Y., Lu J., Zhou C., Wang T. Protection against experimental stroke by ganglioside GM1 is associated with the inhibition of autophagy // PLoS One. 2016. Vol. 11. No 1. e0144219. doi: 10.1371/journal.pone.0144219.

15. Tao J, Shen C, Sun Y, Chen W, Yan G. Neuroprotective effects of pinocembrin on ischemia/reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy // Biomed. Pharmacother. 2018 Vol. 106. Pp. 1003-1010. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.026.
16. Yu X. R., Jia C. R., Gao G. D., Wang S. H., Han Y., Cao W. Neuroprotection of insulin against stress-induced apoptosis in cultured retinal neurons: involvement of phoshoinositide 3-kinase/Akt signal pathway // Acta Biochem. Biophys. Sin. 2006. Vol. 38 Pp. 241-248. doi:10.1111/j.1745-7270.2006.00152.x.
17. Duarte A. I., Santos P., Oliveira, C. R., Santos M. S., Rego A. C. Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3β signaling pathways and changes in protein expression // Biochim. Biophys. Acta. 2008. Vol. 1783. Pp. 994-1002. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.02.016.
18. Collino M., Aragno M., Castiglia S., Tomasinelli C., Thiemermann C., Boccuzzi G., Fantozzi R. Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3beta // Diabetes. 2009. Vol. 58. Pp. 235-242. doi: 10.2337/db08-0691.
19. Auciello F. R., Ross F. A., Ikematsu N., Hardie D. G. Oxidative stress activates AMPK in cultured cells primarily by increasing cellular AMP and/or ADP // FEBS Lett. 2014. Vol. 588. No18. Pp. 3361-3366. doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.025.
20. Rousset C. I., Leiper F. C., Kichev A., Gressens P., Carling D., Hagberg H., Thornton C. A dual role for AMP-activated protein kinase (AMPK) during neonatal hypoxic-ischaemic brain injury in mice // J. Neurochem. 2015. Vol. 133. Pp. 242-252. doi: 10.1111/jnc.13034.
21. Shen Y., Honma N., Kobayashi K., Jia L. N., Hosono T., Shindo K., Ariga T., Seki T. Cinnamon extract enhances glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myocytes by inducing LKB1-AMP-activated protein kinase signaling // PLoS One. 2014. Vol. 9. No 2. e87894. doi: 10.1371/journal.pone.0087894. eCollection 2014.

© Баюнова Л.В., Захарова И.О., Ильясов И.О., Аврова Д.К., Фокина Е.А, Аврова Н.Ф., 2022

УДК: 612.282; 612.216.2
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.4

РЕАКЦИИ ДЫХАНИЯ НА МИКРОИНЪЕКЦИИ БАКЛОФЕНА И 2-ГИДРОКСИСАКЛОФЕНА В РЕТРОТРАПЕЦИЕВИДНОЕ ЯДРО У КРЫС

© Будаев А.И.[1*], Конашенкова А.Т.[1], Ведясова О.А.[1], Ковалева Т.Е.[2]
[1] Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, г. Самара, Россия
[2] Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, г. Самара, Россия
* budaev.sasha@mail.ru

Аннотация. В острых экспериментах на наркотизированных уретаном взрослых крысах изучали изменения паттерна внешнего дыхания в ответ на микроинъекции растворов (концентрация 10^{-4} М) агониста (баклофена) и антагониста (2-гидроксисаклофена) ГАМК$_B$-рецепторов в ретротрапециевидное ядро (РТЯ). Введение веществ в РТЯ осуществляли унилатерально при помощи стеклянной микроканюли и микрошприца по стереотаксическим координатам через трепанационное отверстие в затылочной кости. Для регистрации дыхания использовали методику спирографии. Установлено, что микроинъекции баклофена в РТЯ оказывали угнетающее влияние на внешнее дыхание, начиная с первых минут воздействия. У крыс снижались минутная вентиляция легких и объемная скорость инспираторного потока, что обеспечивалось, в первую очередь, уменьшением дыхательного объема. Временные параметры дыхания при этом достоверно не менялись. Микроинъекции раствора 2-гидроксисаклофена в РТЯ стимулировали внешнее дыхание за счет нарастания величины дыхательного объема по ходу экспозиции. В то же время блокатор ГАМК$_B$-рецепторов, в отличие от агониста, оказывал закономерное влияние и на фазовую структуру дыхательного цикла, в частности менял продолжительность инспирации. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ГАМК$_B$-рецепторы в области РТЯ участвуют в центральных механизмах респираторного контроля. Рецепторы данного класса, вероятно, преимущественно включены в управление нейронными структурами, регулирующими объемные параметры паттерна внешнего дыхания, и в меньшей степени участвуют в механизмах регуляции его частотных параметров.

Ключевые слова: ретротрапециевидное ядро; ГАМК$_B$-рецепторы; баклофен; 2-гидроксисаклофен; внешнее дыхание.

RESPIRATORY RESPONSES TO MICROINJECTIONS OF BACLOFEN AND 2-HYDROXYSACLOFEN INTO THE RETROTRAPEZOID NUCLEUS IN RATS

Budaev A.I.[1*], Konashenkova A.T.[1], Vedyasova O.A.[1], Kovaleva T.E.[2]
[1] Samara National Research University, Samara, Russia
[2] N.V. Postnikov Samara Region Clinical Tuberculosis Dispensary, Samara, Russia
* budaev.sasha@mail.ru

Abstract. Reactions of external respiration to microinjections of solutions of the GABA receptor agonist (baclofen) and its antagonist (2-hydroxysaclofen), at a concentration of 10^{-4} M into the retrotrapezoid nucleus (RTN) in adult anesthetized rats were studied. Solutions were introduced into RTN unilaterally using a glass microcannula along stereotaxic coordinates through a trepanation hole in the occipital bone. Spirography was used to record respiration.

It was established that microinjections of baclofen into RTN had an inhibitory effect on external respiration, starting from the first minutes of exposure. In rats, the minute ventilation of the lungs and the volumetric rate of the inspiratory flow declined, which was ensured, first of all, by a decrease in the tidal volume. The frequency parameters of respiration did not change significantly. Microinjections of a solution of 2-hydroxysaclofen into RTN stimulated external respiration due to an increase in the tidal volume during exposure. At the same time, the GABA$_B$-receptor blocker, in contrast to the agonist, had a regular effect on the phase structure of the respiratory cycle, in particular, changed the duration of inspiration. The experimental data indicate that GABA$_B$-receptors in the RTN region are involved in the central mechanisms of respiration control. Receptors of this class are probably mainly involved in the activity of neural networks that regulate the volumetric parameters of the external respiration pattern, and to a lesser extent participate in the mechanisms of regulation of its frequency parameters.

Keywords: retrotrapezoid nucleus; GABA$_B$-receptors; baclofen; 2-hydroxysaclofen; external respiration.

Введение

Регуляция дыхания осуществляется сложноустроенной системой локальных нейронных сетей, представленных различными структурными элементами центральной нервной системы, среди которых главная роль принадлежит различным популяциям дыхательных нейронов ствола головного мозга. Одной из таких респираторных нейросетей, вызывающих интерес с точки зрения регуляции ритма и паттерна дыхания, является ретротрапециевидное ядро (РТЯ) – главная хемочувствительная зона вентролатеральной области мозгового ствола [3]. Нейроны РТЯ идентифицируется по уникальной совокупности маркеров, таких как транспортер глутамата VGLUT2, фактор транскрипции Phox2b, рецепторы к веществу Р и калиевый канал TASK-2 [14], которые и определяют физиологическую роль данного ядра в респираторном контроле.

Особая роль РТЯ в регуляции дыхания обусловлена не только нейрохимическим профилем его нейронов, но и многочисленными связями с другими отделами дыхательного центра. Известно, что нейроны РТЯ имеют возбуждающие проекции в ростральный и каудальный отделы вентральной респираторной группы, понтинную респираторную группу, а также в комплексы Бетцингера и пре-Бетцингера [5], отвечающие за респираторный ритмогенез. Синаптические контакты РТЯ оказывают модулирующие влияния на процессы регуляции ритма и паттерна дыхания, благодаря множеству нейромедиаторных веществ, включая ГАМК [13], глутамат [10], серотонин [6], АТФ [7] и др. Среди перечисленных нейромедиаций до сих пор недостаточно изученными остаются роль и рецепторные механизмы участия ГАМК в формировании респираторных реакций на уровне РТЯ. Следует указать, что в работах, посвященных этой проблеме, внимание исследователей ранее было направлено на анализ участия $ГАМК_A$-рецепторов РТЯ в респираторном контроле, причем условиях измененного газового баланса крови [8, 13], тогда как вклад $ГАМК_B$-рецепторов не рассматривался.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении респираторных реакций при стимуляции и блокаде $ГАМК_B$-рецепторов РТЯ у крыс, дышащих атмосферным воздухом обычного состава.

Материалы и методы

Были поставлены острые опыты на взрослых беспородных крысах (n=21) массой 180-250 г, наркотизированных уретаном (1,6 мг/кг, внутрибрюшинно). Исследование проведено с соблюдением правил биоэтики. У крыс в двух экспериментальных сериях

регистрировали внешнее дыхание до и после микроинъекций в РТЯ 200 нл раствора агониста (баклофен, серия 1, n=8) и антагониста (2-гидроксисаклофен, серия 2, n=7) $ГАМК_B$-рецепторов. Для инъекций использовали растворы веществ в концентрации 10^{-4} М, которые через стеклянную микроканюлю (диаметр кончика 50 мкм, длина кончика не менее 12 мм), закрепленную на микрошприце МШ-1, вводили в РТЯ через трепанационное отверстие в затылочной кости по стереотаксическим координатам [12]. Крысам контрольной группы (серия 3, n=6) в том же объеме в РТЯ инъецировали искусственную спинномозговую жидкость. Респираторные реакции оценивали по паттерну внешнего дыхания, которое регистрировали с помощью миниатюрного спирографа, подсоединяемого к животному через трахеостомическую трубку. От спирографа сигналы передавались на усилитель, далее на компьютер в виде пневмотахограммы, а затем преобразовывались в спирограмму. На спирограммах определяли длительность вдоха (Твд, с) и выдоха (Твыд, с), дыхательный объем (ДО, мл). Рассчитывали частоту дыхания (ЧД, $мин^{-1}$), объемную скорость инспираторного потока (Vинс, мл/с), минутный объем дыхания (МОД, мл/мин). Запись велась непрерывно в исходном состоянии и в течение 60 минут после микроинъекции.

Статистический анализ результатов проводили в программе SigmaPlot 12.5. Использовали test Shapiro – Wilk, paired t-test и One Way ANOVA. Данные сравнивали с контролем и в отдельных случаях с исходным состоянием. Результаты представляли как среднее арифметическое значение ± ошибка среднего (M ± SEM). Статистически значимыми считали изменения при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что микроинъекции в РТЯ агониста $ГАМК_B$-рецепторов баклофена вызывали у крыс угнетение внешнего дыхания. Активация метаботропных ГАМК-рецепторов приводила к кратковременной пролонгации фазы вдоха сразу после введения (на 12,1% относительно исходного уровня), а затем эффект увеличения Твд воспроизводился в конце экспозиции и, в частности, на 60-й минуте составлял 14,1% (Рис. 1, А). Продолжительность экспираторной фазы дыхательного цикла также проявляла тенденцию увеличения, однако в отличии от инспираторной фазы, Твыд имела только один период максимального проявления эффекта – во второй половине часовой экспозиции. Так на 40-й минуте Твыд увеличивалась на 20,5% относительно исходного уровня (Рис. 1, Б). Увеличение продолжительности обеих фаз дыхательного цикла приводило к

закономерному снижению ЧД, что отмечалось с первых минут после введения баклофена в РТЯ с максимальным проявлением эффекта в 10,0% относительно исходного значения на 20-й минуте (Рис. 1, В).

Помимо этого при анализе респираторных реакций на введение в РТЯ баклофена было выявлено значительное снижение объемных показателей дыхания. Уменьшение такого параметра, как дыхательный объем (ДО) отмечалось на протяжении всей экспозиции, но в более выраженном виде на 2-й минуте наблюдений на 12,9% ($p<0,05$) от исходной величины (Рис. 2, А). Угнетение ДО закономерно вызывало замедление скорости инспираторного потока (Vинс). Эта реакция формировалась уже сразу после микроинъекции и сохранялась на протяжении всего периода записи, однако наблюдаемые изменения достигали достоверного значения только к 40-й минуте и составляли 20,7% ($p<0,05$) относительно исходного уровня (Рис. 2, Б). Одновременное снижение дыхательного объема и частоты дыхания привело к уменьшению минутного объема дыхания (МОД), отмечаемому уже на первой минуте после микроинъекции баклофена, максимальный эффект (18,7%; $p<0,05$) наблюдался на 3-й минуте (Рис. 2, В). Достоверное снижение уровня МОД в ранние сроки экспозиции также отмечалось при сравнении экспериментальных данных с контрольными значениями ($p<0,05$).

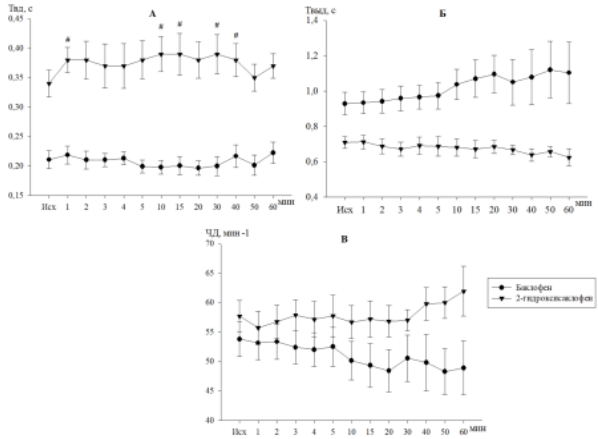


Рис. 1. Изменения временных параметров паттерна внешнего дыхания при микроинъекциях баклофена и 2-гидроксисаклофена в РТЯ у крыс. # ($p<0,05$), ## ($p<0,01$) – статистически значимые различия с исходным уровнем.

Результаты экспериментов с введением 2-гидроксисаклофена в РТЯ показали, что блокада $ГАМК_B$-рецепторов в целом приводила к стимуляции внешнего дыхания, при этом вклад временных показателей в данную реакцию оказался не очень значимым Так, продолжительность экспираторной фазы дыхательного цикла проявляла слабую тенденцию к укорочению, которое, тем не менее, отмечалось со 2-й минуты и до конца записи, но наиболее заметно (снижение на 12,0 %) на 60-й минуте (Рис. 1, Б). Наряду с этим уже с первой минуты после введения блокатора достоверно увеличивалась продолжительность фазы инспирации (на 11,4%; $p<0,05$), в дальнейшем данный эффект сохранялся на том же уровне вплоть до 40-й минуты экспозиции (Рис. 1, А). Разнонаправленность изменений Твд и Твыд приводила к тому, что частота дыхания на фоне действия 2-гидроксисаклофена изменялась весьма неоднозначно. Начиная с первой минуты после микроинъекции происходило уменьшение ЧД, на 40-й минуте реакция сменялась на тенденцию увеличения, которая наблюдалась до конца экспозиции, но имела небольшую выраженность (Рис. 1, В).

Что касается объемных параметров дыхания, то их изменения при введении 2-гидроксисаклофена в РТЯ характеризовались большей выраженностью и продолжительностью, нежели изменения временных показателей. А именно, дыхательный объем увеличивался уже с первых минут экспозиции, причем увеличение ДО по мере действия блокатора усиливалось и достигало статистически значимого уровня (в среднем 35,2 %) в интервале от 15-й ($p<0,05$) до 50-й ($p<0,01$) минуты (Рис. 2, А). Достоверность роста дыхательного объема при микроинъекциях 2-гидроксисаклофена в РТЯ также подтвердилась при сравнении результатов, полученных у экспериментальных животных, с контролем. Существенное отличие от контроля было зафиксировано на 15-й минуте ($p<0,05$). Прирост дыхательного объема пропорционально увеличивал объемную скорость инспираторного потока с 20-й по 40-ю минуты. Статистически значимый максимум прироста Vинс отмечался на 40-й минуте действия антагониста и составлял 20,2 % ($p<0,05$) от исходного уровня (Рис. 2, Б). На фоне этих реакций было выявлено усиление минутной величины легочной вентиляции в течение всего периода регистрации спирограммы. На это указывает динамика МОД, максимальное статистически значимое увеличением которого (на 40,0 %; $p<0,05$) отмечалось на 50-й минуте после микроинъекции 2-гидроксисаклофена (Рис. 2, В).

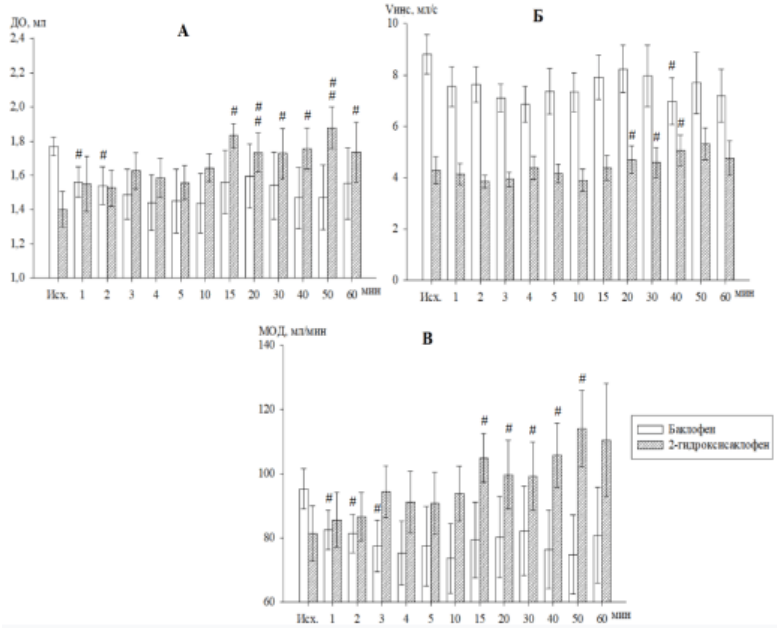


Рис. 2. Изменение объемных параметров паттерна внешнего дыхания при микроинъекциях баклофена и 2-гидроксисаклофена в РТЯ у крыс. # ($p<0,05$), ## ($p<0,01$) – статистически значимые различия с исходным уровнем.

Таким образом, микроинъекции агониста (баклофена) и блокатора (2-гидроксисаклофена) ГАМК$_B$-рецепторов в РТЯ вызывали соответственно угнетение и стимуляцию внешнего дыхания. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности ГАМКергической нейротрансмиссии в процессы регуляции дыхания структурами РТЯ. Наблюдаемое нами угнетение дыхания при активации метаботропных ГАМК$_B$-рецепторов баклофеном согласуется с результатами исследований, посвященных анализу респираторных реакций на активацию ионотропных ГАМК$_A$-рецепторов РТЯ мусцимолом, что в целом свидетельствует о значении ГАМКергического торможения в области РТЯ для регуляции дыхания. Так, в работе Takakura et al. было показано, что двусторонняя инъекция мусцимола в концентрации 2 мМ в РТЯ устраняет возбуждение диафрагмального нерва в ответ на гиперкапническую стимуляцию [13]. Nattie & Li [8] в своем исследовании установили, что микродиализ агониста ГАМК$_A$-рецепторов в РТЯ у крыс, дышащих обычным атмосферным воздухом, приводит к снижению легочной вентиляции и

дыхательного объема и показали дозозависимый характер влияния активации ионотропных рецепторов ГАМК на частоту дыхания, которая достоверно увеличивалась только при концентрации агониста в 10 мМ. В нашем предыдущем исследовании с введением в РТЯ у крыс раствора мусцимола (10^{-7} М) было выявлено угнетение дыхания в виде снижения уровня МОД [1], что совпадает с направленностью изменений вентиляции легких при активации ГАМКв-рецепторов указанного ядра баклофеном в настоящей работе.

При блокаде $ГАМК_B$-рецепторов РТЯ в опытах с микроинъекциями 2-гидроксисаклофена, в свою очередь, возникали респираторные реакции (усиление дыхания), сходные с эффектами, регистрируемыми при воздействии блокатора $ГАМК_A$-рецепторов бикукуллина. Так, в наших опытах микроинъекции 2-гидроксисаклофена в РТЯ вызывали увеличению дыхательного объема и легочной вентиляции, что аналогично эффектам, наблюдаемым другими авторами при воздействии растворов бикукуллина на РТЯ путем микродиализа [9]. Следует отметить, что схожие изменения паттерна внешнего дыхания возникали также после микроинъекций 2-гидроксисаклофена в парафациальную респираторную группу [2], что может быть объяснено тесными синаптическими контактами и переслаиванием нейронов этой группы и РТЯ, а также подобием организации ГАМКцептивных структур в этих хемочувствительных регионах вентролатеральной области продолговатого мозга. Отмечая значительную выраженность изменений дыхательного объема, скорости инспираторного потока и минутной вентиляции легких при действии 2-гидроксисаклофена, допустимо говорить о преимущественном вовлечении $ГАМК_B$-рецепторов РТЯ в бульбарные механизмы регуляции именно объемных параметров паттерна внешнего дыхания.

Стоит также отметить различие во времени проявления респираторных эффектов микроинъекций изучаемых веществ. Так, воздействие баклофена вызывало изменение внешнего дыхания преимущественно в ранние сроки экспозиции, в то время как реакции на инъекции 2-гидрокосаклофена статистически значимо проявлялись в основном в конце экспозиции, что отчетливо видно на рисунке 2. Наблюдаемое явление можно объяснить различными механизмами действия используемых веществ, в том числе тем, что блокада $ГАМК_B$-рецепторов, вероятно, развивается медленно и ее эффекты постепенно нарастают во времени, в то время как активация $ГАМК_B$-рецепторов происходит более быстро и имеет кратковременный характер.

С учетом наших данных и результатов других исследований позволительно считать, что тормозное действие ГАМК в области РТЯ опосредуется не только $ГАМК_A$-, но и $ГАМК_B$-рецепторами, хотя, возможно, метаботропные рецепторы ГАМК представлены в изучаемом ядре на так широко, как ионотропные. В реализации ГАМКергического торможения участвуют $ГАМК_B$-рецепторы,

расположенные как на пре-, так и на постсинаптической мембранах нейронов. Рецепторы пресинаптической локализации могут ингибировать Ca^{2+}-активируемые ионные каналы, тем самым препятствуя высвобождению нейротрансмиттера [4] и за счет этого, прекращать поступление сигналов к респираторным нейронам РТЯ. В то же время активация популяции постсинаптических $ГАМК_B$-рецепторов способна вызывать гиперполяризацию нейрональных мембран за счет усиления тока ионов K^+ из клетки через G-белок-активируемые калиевые каналы [11], в результате чего может нарушаться передача импульсов от РТЯ в другие отделы центральной респираторной нейронной сети.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у крыс $ГАМК_B$-рецепторы РТЯ являются важным звеном центральных механизмов респираторного контроля, в том числе обеспечивают реализацию тормозных эффектов ГАМК на нейроны, участвующие в регуляции ритмики дыхания и его глубины. Вовлеченность данного типа рецепторов в тормозную модуляцию внешнего дыхания и регуляцию его различных параметров неравнозначна, при этом есть основания полагать, что изменение уровня активности $ГАМК_B$-рецепторов РТЯ в большей степени влияет на деятельность локальных респираторных сетей, контролирующих величину объемных показателей спирограммы, таких как минутный объем дыхания, дыхательный объем и объемная скорость инспираторного потока.

Исследование проведено с соблюдением правил биоэтики в соответствии с требованиями Community Council Directive 2010/63/EEC.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Ведясова О.А., Ковалева Т.Е., Будаев А.И. Анализ роли ГАМКергических механизмов в регуляции респираторной активности парафациальных структур ствола мозга у крыс // Биомедицина. 2020. Vol. 16. С. 56–64. https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-56-64.

2. Ковалева Т.Е., Ведясова О.А. Участие $ГАМК_B$-рецепторов парафациальной респираторной группы в регуляции дыхания у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 168. № 7. С. 28–32.

3. Bochorishvili G., Stornetta R.L., Coates M.B., Guyenet P.G. Pre-Bötzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons // The Journal of Comparative Neurology. 2012. Vol. 520. P. 1047–1061. https://doi.org/10.1002/cne.22769.

4. Gassmann M., Bettler B. Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition // Nat. Rev. Neurosci. 2012. Vol. 13. P. 380–394. doi: 10.1038/nrn3249.
5. Guyenet P. G., Stornetta R. L. Rostral ventrolateral medulla, retropontine region and autonomic regulations // Auton. Neurosci. 2022. Vol. 237. doi: 10.1016/j.autneu.2021.102922.
6. Leirão I. P., Colombari D. S. A., da Silva G. S. F., Zoccal D. B. Lesion of serotonergic afferents to the retrotrapezoid nucleus impairs the tachypneic response to hypercapnia in unanesthetized animals // Neuroscience. 2020. Vol. 452. P. 63–77. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.
7. Moreira T. S., Sobrinho C. R., Falquetto B., Oliveira L. M., Lima J. D., Mulkey D. K., Takakura A. C. The retrotrapezoid nucleus and the neuromodulation of breathing // J. Neurophysiol. 2021. Vol. 125. № 3. P. 699–719. doi: 10.1152/jn.2020.
8. Nattie E., Li A. Muscimol dialysis in the retrotrapezoid nucleus region inhibits breathing in the awake rat // J. Appl. Physiol. 2000. Vol. 89. P. 153–162. doi: 10.1152/jappl.2000.89.1.153.
9. Nattie E., Shi J., Li A. Bicuculline dialysis in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region stimulates breathing in the awake rat // Respir. Physiol. 2001. Vol. 124. P. 179–193. doi: 10.1016/s0034-5687(00)00212-7.
10. Olivares M. J., Flores A., von Bernhardi R., Eugenín J. Astrocytic contribution to glutamate-related central respiratory chemoreception in vertebrates // Respir. Physiol. Neurobiol. 2021. Vol. 294. doi: 10.1016/j.resp.2021.103744.
11. Shaye H., Stauch B., Gati C., Cherezov V. Molecular mechanisms of metabotropic $GABA_B$ receptor function // Sci. Adv. 2021. Vol. 7(22):eabg3362. doi: 10.1126/sciadv.abg3362.
12. Souza G. M. P. R., Stornetta R. L., Stornetta D. S., Abbott S. B. G., Guyenet P. G. Contribution of the retrotrapezoid nucleus and carotid bodies to hypercapnia- and hypoxia-induced arousal from sleep // J. Neurosci. 2019. Vol. 39. P. 9725–9737. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1268-19.2019.
13. Takakura A. C., Colombari E., Menani J. V., Moreira T. S. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2011. Vol. 300. P. 501–510. doi: 10.1152/ajpregu.00220.2010.
14. Wei Z., Hao Y., Yu H., Shi L., Jing X., Zhang X., Liu N., Li T., Zhang X., Yuan F. Disordered leptin signaling in the retrotrapezoid nucleus is associated with the impaired hypercapnic ventilatory response in obesity // Life Sci. 2020. Vol. 257. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117994.

© Будаев А.И., Конашенкова А.Т., Ведясова О.А., Ковалева Т.Е.,2022

УДК: 612.821
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.5

СРАВНЕНИЕ МАТЕРИНСКОЙ РЕАКЦИИ КРЫС ЛИНИЙ WISTAR И WAG/RIJ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГАЛОПЕРИДОЛА В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

© Буянова А.А.*, Садртдинова И.И.
Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия
* shura.buyanova@list.ru

Аннотация. Цель данной работы заключалась в изучении изменений послеродовой депрессии самок крыс линий Wistar и WAG/Rij до и после введения галоперидола в условиях нормы (красный свет) и при моделировании стресса (яркий свет). Кормящих самок крыс линий Wistar и WAG/Rij с детенышами с 6-го по 8-й день родов помещали на край арены «открытого поля». В условиях красного и яркого света шла оценка показателей исследовательской активности животного, фиксировались такие показатели, как пробег, количество стоек и отходов от стенки поля, продолжительность груминга. Оценивались параметры материнской активности: латентный период первого подхода, латентный период первого переноса, общие количество подходов и общие количество переносов. Для самок крыс линии WAG/Rij также фиксировался показатель частоты замираний, который отражает психоэмоциональное состояние данной линии. В условиях яркого света родительское поведение самок обеих линий проявляется сильнее, чем при красном освещении. Галоперидол положительно действует на психоэмоциональное состояние и родительскую реакцию самок крыс линии WAG/Rij, также препарат характеризуется слабым действием на нигростриарный путь.

Ключевые слова: материнская депрессия; галоперидол; самки крыс линии Wistar и WAG/Rij; стресс.

COMPARISON OF MATERNAL REACTIONS OF WISTAR AND WAG/RIJ RATS UNDER THE ACTION OF HALOPERIDOL UNDER STRESS

© Buyanova A.A.*, Sadrtdinova I.I.
Bashkir State University, Ufa, Russia
* shura.buyanova@list.ru

Abstract. The aim of this work was to study changes in postpartum depression in female rats of the Wistar and WAG/Rij lines before and after administration of haloperidol under normal conditions (red light) and under

stress modeling (bright light). Nursing female rats of the Wistar and WAG/Rij lines with cubs from the 6th to the 8th day of childbirth were placed on the edge of the "open field" arena. In conditions of red and bright light, the indicators of the animal's research activity were evaluated, such indicators as mileage, the number of racks and waste from the field wall, the duration of grooming were recorded. The parameters of maternal activity were evaluated: the latent period of the first approach, the latent period of the first transfer, the total number of approaches and the total number of transfers. For female rats of the WAG/Rij line, an indicator of the frequency of fading was also recorded, which reflects the psychoemotional state of this line. In bright light conditions, the parental behavior of females of both lines is more pronounced than in red light. Haloperidol has a positive effect on the psychoemotional state and parental reaction of female rats of the WAG/Rij line, and the drug is also characterized by a weak effect on the nigrostriatal pathway.

Keywords: maternal depression; haloperidol; female Wistar and WAG/Rij rats; stress.

Введение

Одним из ключевых этапов в эволюции живых организмов является забота о потомстве, особенно сильно родительский инстинкт развит у самок.

Для человека родительское поведение проявляется не просто в защите и кормлении, но и в воспитании, что позволяет человеку стать полноценной частью общества, переняв от старшего поколения характерные для данного общества традиции и правила поведения. Материнская депрессия нарушает взаимоотношения в диаде «мать-дитя», искажая данный алгоритм и приводя к девиантным формам поведения ребенка. Стоит отметить, что заболевание тесно связано не только с биологическими, но и социально-экономическими показателями статуса женщины, а значит, имеет широкое распространение в обществе: отдельные симптомы встречаются у половины матерей, 10% - ярко выраженная патология, 17% - женщины без биологических, психологических и социально-экономических предпосылок к развитию заболевания [5]. Однако, несмотря на широкое распространение и прогрессирующие темпы послеродовой депрессии, проблеме уделено относительно мало внимания, а результаты, в том числе и при тестировании препаратов часто противоречивы.

Общепризнанной моделью материнского поведения считаются крысы (их материнский инстинкт достаточно сложный и хорошо

изучен), а моделью материнской депрессии являются самки крыс линии WAG/Rij [4].

Цель данной работы заключалась в изучении изменений послеродовой депрессии самок крыс линий Wistar и WAG/Rij до и после введения галоперидола в условиях нормы (красный свет) и при моделировании стресса (яркий свет).

Материалы и методы

Работа была проведена на половозрелых самках крыс линий Wistar и WAG/Rij (m = 200-220 гр.). Контрольная и опытная группы включали в себя по 10 самок обеих линий. При выполнении данной работы выполнялись Международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (2000 г.). Крысы были выращены в виварии кафедры физиологии и общей биологии Башкирского государственного университета, их содержали в отдельных клетках при постоянных показателях температуры (20-22°С) и влажности и со свободным доступом к воде и пище.

Исследования проводились с 6-го по 8-й день родов, сам день родов считался 0-м. Для тестов была использована установка «открытое поле», которая представляет собой круглую арену, разделенную на квадраты, в центре арены расположена чашка Петри. Арена окружена стенкой, высота которой 80 см. С 1-го по 3-й день эксперимента опытной группе вводили внутримышечно галоперидол в дозе 0,1 мг/кг. Ежедневно в ходе тестирования самка трижды помещалась на край арены «поля», т.е. эксперимент состоял из 3-х этапов: первый этап – при красном свете (норма, безопасная среда), без детеныша в течение 120 сек. оценивались параметры горизонтальной и вертикальной активности животного: пробег, количество стоек, количество отходов от стенки поля, частота и продолжительность груминга, для оценки психоэмоционального состояния самок крыс линии WAG/Rij фиксировались параметры продолжительности и частоты замираний. Затем самку отсаживали на 60 сек., после чего повторно помещали на край арены. Второй этап – при красном свете на 120 сек. в чашку Петри помещались детеныши, и оценивались параметры родительской реакции самок крыс обеих линий: латентный период (ЛП) первого подхода, ЛП первого переноса, общие количество подходов и общие количество переносов. После самку повторно отсаживали на 60 сек. и повторно помещали край арены «поля». Третий этап – на протяжении 120 сек. при ярком свете с детенышем фиксировались те же параметры родительского поведения: латентный период (ЛП) первого подхода, ЛП первого переноса, общие количество

подходов и общие количество переносов. Стресс моделировали с помощью изменения освещения с красного на яркое [1, 2, 3]. Полученные данные обрабатывались в программе «STATISTICA v.7.0» (Stat Soft Inc., США).

Результаты и обсуждения

Было обнаружено, что самки обеих линий более качественнее и быстрее проявляют материнский инстинкт при ярком свете, т.е. стресс оказывает активизирующее влияние на материнское поведение, так с 6-го по 8-й день после родов самки обеих линий быстрее находят детеныша: с 22,35±1,25 сек. по 4,07±1,38 сек. у самок крыс линии Wistar и с 24,05±1,17 сек. по 8,33±0,21 сек. у самок крыс линии WAG/Rij ($p<0,05$), аналогичные показатели при красном свете с 27,30±3,75 сек. по 7,36±1,14 сек. (Wistar) и с 48,03±1,25 сек. по 12,13±0,12 сек. (WAG/Rij) ($p<0,05$). Схожая динамика наблюдается и с ЛП первого переноса ($p<0,05$). Галоперидол незначительно влияет на способность животных к адаптации и обучению, что видно из показателей ЛП первого подхода при ярком свете: с 27,06±0,29 сек. по 7,38±0,27 сек. у самок крыс линии Wistar и с 25,01±0,37 сек. по 10,21±0,17 сек. у самок крыс линии WAG/Rij, в условиях красного освещения динамика к снижению показателя с 1-го по 3-й день тестирования также сохраняется, а увеличение времени затраченного на поиск детеныша (ЛП первого подхода) после введения галоперидола можно объяснить действием препарата на нигростриарный путь животного ($p<0,05$). Качественные различия до и после введения препарата можно наблюдать по общему количеству подходов (рис. 1) и переносов (рис. 2) в условиях красного света. Это, возможно, связано с пресинаптическим действием препарата.

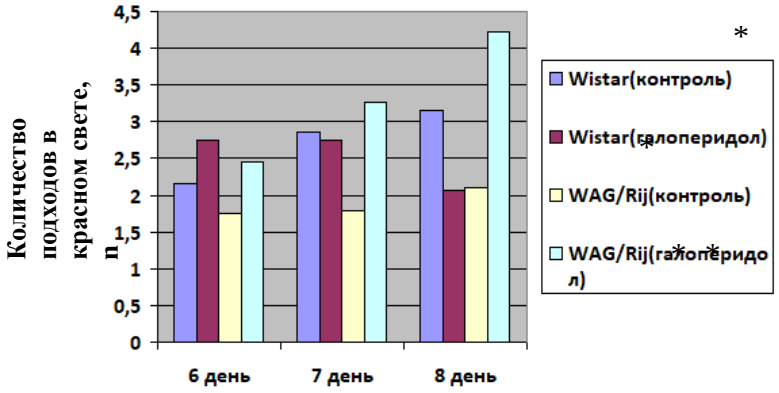


Рис. 1. Средние значения количества подходов к детенышам при красном свете в тесте «открытое поле» самок крыс линий Wistar и WAG/Rij до (контроль) и после (галоперидол) введения препарата.

Примечание: * - статистические значимые различия при сравнении значений в 1-й и 3-й дни эксперимента при $p<0,05$.

Как видно из рис. 1. у самок крыс линии WAG/Rij показатель общего количества подходов значительно возрастает к 8-му дню после родов.

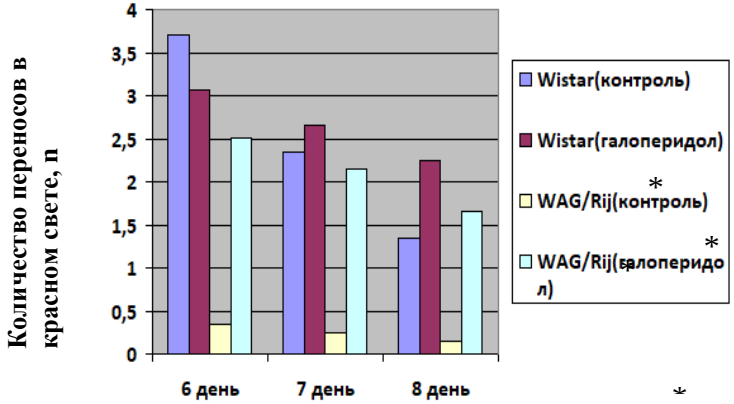


Рис. 2. Средние значения количества переносов детенышей при красном свете в тесте «открытое поле» самок крыс линий Wistar и WAG/Rij до (контроль) и после (галоперидол) введения препарата.

Примечание: * - статистические значимые различия при сравнении значений в 1-й и 3-й дни эксперимента при $p<0,05$.

Исходя из рис. 2. можно сделать вывод, что после введения галоперидола у самок обеих линий крыс к 3-му дню эксперимента увеличилось общие количество переносов при красном свете по сравнению с контрольной группы.

При ярком свете общее количество подходов было больше у самок крыс контрольной группы линии Wistar, что связано с его постсинаптическим действием и влиянием на двигательную активность животного ($p<0,05$).

Мы наблюдали достоверное увеличение общего числа переносов у опытной группы самок крыс линии WAG/Rij в условиях яркого освещения по сравнению с контрольными животными (рис. 3.).

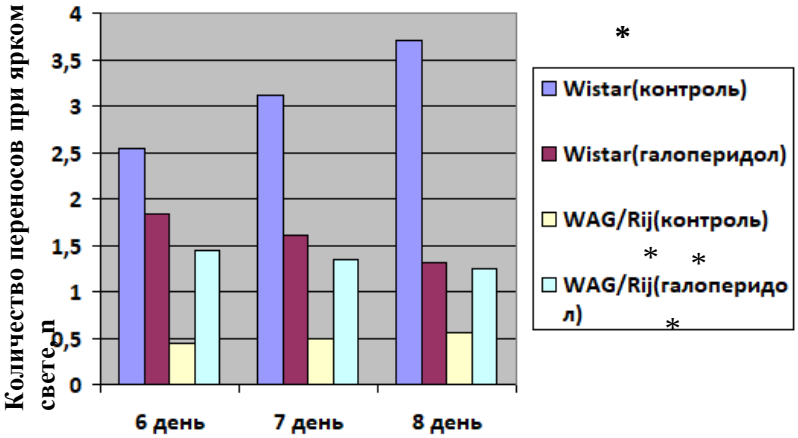


Рис. 3. Средние значения количества переносов детенышей при ярком свете в тесте «открытое поле» самок крыс линий Wistar и WAG/Rij до (контроль) и после (галоперидол) введения препарата.

Примечание: * - статистические значимые различия при сравнении значений в 1-й и 3-й дни эксперимента при $p<0,05$.

Как видно из рис. 3. галоперидол положительно повлиял на активное материнское поведение самок крыс линии WAG/Rij ($p<0,05$).

Улучшение психоэмоционального состояния самок крыс линии WAG/Rij отражают показатели продолжительности груминга (рис. 4) и среднего количества замираний (рис. 5).

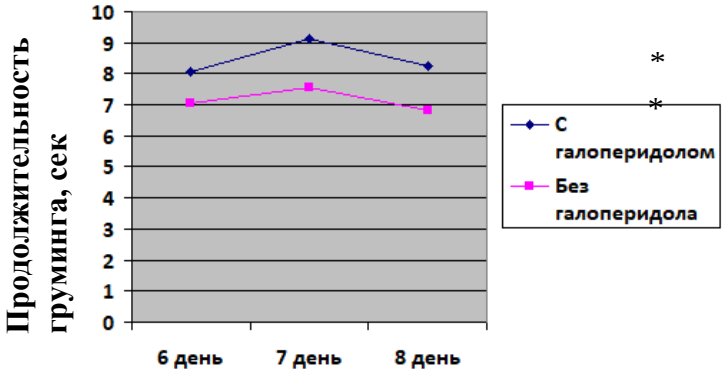


Рис. 4. Средний показатель продолжительности груминга у самок линии WAG/Rij.

Примечание: * - статистические значимые различия при сравнении значений в 1-й и 3-й дни эксперимента при p<0,05.

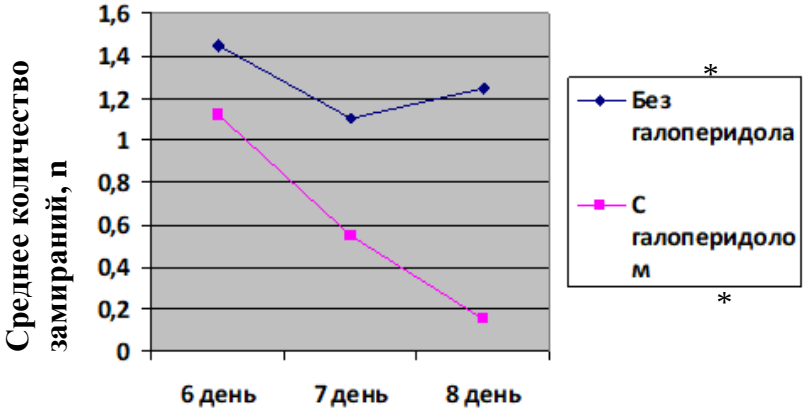


Рис. 5. Среднее количество замираний у самок крыс линии WAG/Rij.

Примечание: * - статистические значимые различия при сравнении значений в 1-й и 3-й дни эксперимента при p<0,05.

Как видно из рис. 4. и рис. 5. происходит увеличение продолжительности груминга и снижение среднего количества замираний, что доказывает положительное действие препарата на эмоционального состояние самок крыс линии WAG/Rij (p<0,05).

Таким образом, наши результаты доказали активизирующие влияние стресса на материнское поведение самок обеих линий крыс и показали положительное влияние галоперидола на родительское поведение самок крыс линии WAG/Rij. Полученные нами данные согласуются с результатами работ Ю.В. Добряковой, В.А. Дубынина, Ю.А. Ивлевой и К.Ю. Саркисовой.

Литература

1. Добрякова Ю. В., Дубынин В. А., Ван Луийтелаар Ж. Материнское поведение крыс линии WAG/Rij в норме и при действии на дофаминергическую систему мозга // Журн. высш. нерв. деят. 2010. Т 6. №3. С. 372-380.
2. Дубынин В.А., Танаева К.К. Материнская депрессия: когда счастье не в радость // Наука из первых рук: Попасть в десятку. 2014. Т. 55. № 1. С. 51-59
3. Ивлева Ю.А., Дубынин В.А., Дмитриева Т.А., Андреева Л.А., Каменский А.А. Влияние бета-казо-морфина-7 на материнскодетское взаимодействие белых крыс // Вестн. МГУ. Сер. 16. био. 2003. №4. С.11–16.
4. Саркисова К.Ю., Танаева К.К., Добрякова Ю.В. Условная реакция предпочтения места ассоциированного с детенышами, и материнская забота у депрессивных крыс линии WAG/Rij. // Журн. высш. нерв. деят. 2016. Т. 66. № 2. С. 229-241.
5. Karami Chamgurdani F, Barkin JL, Curry CL, Mirghafourvand M. Comparison of Maternal Functioning between Iranian Mothers with and without Depressive Symptoms: A Case-Control Study // [International journal of environmental research and public health. V.17] / Res. Public Health. 2020. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32408556.

© Буянова А.А., Садртдинова И.И., 2022

УДК: 577.175.44, 57.041, 577.2
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.6

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ТКАНИ ОТДЕЛОВ КОНЕЧНОГО МОЗГА КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

© Васильев Д.С.[1,2]*, Туманова Н.Л.[1], Щербицкая А.Д.[1,2], Милютина Ю.П.[2], Арутюнян А.В.[2]

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

[2] Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург

* dvasilyev@bk.ru

Аннотация. Пренатальная гипергомоцистеинемия (ГГЦ) является одним из осложнений беременности, вызывающих когнитивный дефицит у потомства в постнатальном развитии. ГГЦ матери приводит к нарушению формирования головного мозга у потомства, вызывая клеточную гибель и нейровоспалительные реакции в первый месяц постнатального онтогенеза. В литературе имеются свидетельства наличия нейродегенеративных изменений в ткани кортикальных отделов мозга потомства самок крыс, перенесших ГГЦ в период беременности, однако отсутствуют описания развития патологических изменений структуры головного мозга на протяжении постнатального онтогенеза. Такие исследования необходимы, поскольку изменения в раннем онтогенезе во многом обусловлены следовым воздействием повышенного уровня гомоцистеина, в то время как в более поздний период развиваются наблюдаются отсроченные последствия нарушения онтогенетического развития головного мозга. Мы проводили сравнительное морфологическое исследование ткани дорсального гиппокампа и теменная области коры как в норме, так и на модели пренатальной ГГЦ. Моделирование ГГЦ осуществляли путем ежедневного введения раствора метионина самкам крыс с 4-го дня беременности до родов. Анализ мозга проводили на 5-е, 20-е сутки (P5, P20) постнатального онтогенеза потомства таких самок. На P5 и P20 крыс из потомства матерей, перенесших ГГЦ, отмечалась гибель нейронов в теменной области коры мозга, а также в дорсальном гиппокампе. При этом от P5 к P20 как в коре, так и в гиппокампе развивались нейровоспалительные процессы, выражавшиеся в активации

астроцитарной глии и микроглии, повышении уровня провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6 на фоне снижения уровня антивоспалительного цитокина IL-10. На взрослой стадии гибель нейронов и глиальная реакция отмечены не были, однако наблюдались остаточные патологические изменения, в частности, на ультраструктурном уровне были отмечены нейроны с изменённым тургором, скоплением лизосом и аутофагосом в цитоплазме клеточного тела и дендритных отростков. Результаты исследования указывают на основные молекулярно-клеточные механизмы, вовлечённые в патогенез головного мозга при пренатальной ГГЦ, и демонстрируют основные этапы его развития.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия; гиппокамп; кора мозга; нейровоспаление.

INFLUENCE OF PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA ON THE TISSUE STRUCTURE OF THE TELENCEPHALON IN RATS

Vasilev D.S.[1,2]*, Tumanova N.L.[1], Shcherbitskaia A.D.[1,2], MilyutinaY.P.[2], Arutjunyan A.V. [2]

[1] I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[2] D.O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive medicine, St. Petersburg, Russia

* dvasilyev@bk.ru

Abstract. Prenatal hyperhomocysteinemia (HHC) is one of the common complications of pregnancy that causes offspring cognitive deficits during postnatal development. Maternal HHC leads to impaired brain formation in offspring, causing cell death and neuroinflammatory reactions in the first month of postnatal ontogenesis. There is evidence in the literature of the presence of neurodegenerative changes in the tissue of the cortical parts of the brain in the offspring of female rats that underwent HHC during pregnancy, but there are no descriptions of the development of pathological changes in the structure of the brain during postnatal ontogenesis. Such studies are necessary, since changes in early ontogenesis are largely due to the trace effects of an increased level of homocysteine, while in a later period, delayed consequences of a violation of the ontogenetic development of the brain develop. We performed a comparative histological study of the dorsal hippocampus tissue and the parietal area cortex both in the norm and in the model of prenatal HHC. Modeling of HHC was carried out by daily administration of methionine solution to female rats from the 4th day of pregnancy until delivery. Brain analysis was

performed on days 5, 20 (P5, P20) of postnatal ontogenesis of the offspring of such female rats. On P5 and P20 rats from the offspring of mothers who underwent HHC, neuronal death was noted in the parietal area of the cerebral cortex, as well as in the dorsal hippocampus. At the same time, from P5 to P20, both in the cortex and in the hippocampus, neuroinflammatory processes developed, expressed in the activation of astrocytic glia and microglia, an increase in the level of pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-6 as well as a decrease in the level of anti-inflammatory cytokine IL-10. At the adult stage, neuronal death and glial reaction were not noted, however, residual pathological changes were observed, in particular, neurons with altered turgor, accumulation of lysosomes and autophagosomes in the cytoplasm of the cell body and dendrite processes were observed at the ultrastructural level. The results of the study indicate the main molecular-cellular mechanisms involved in the pathogenesis of the brain during prenatal HHC and demonstrate the stages of its development.

Keywords: hyperhomocysteinemia; hippocampus; cerebral cortex; neuroinflammation.

Введение

Пренатальная гипергомоцистеинемия (ГГЦ) является одним из частых осложнений беременности, вызывающим когнитивный дефицит у потомства в постнатальном развитии. Эффекты высокого уровня гомоцистеина широко изучались другими авторами в постнатальном периоде, однако до сих пор мало что известно о механизмах его пагубного действия в пренатальном периоде. Есть основания полагать, что особенности клеточного ответа на пренатальную ГГЦ (ПГГЦ) в различных отделах мозга, отвечающих за когнитивные функции, могут иметь существенное значение и должны быть подробно охарактеризованы и проанализированы. В литературе имеются свидетельства наличия нейродегенеративных изменений в ткани кортикальных отделов мозга потомства самок крыс, перенесших ГГЦ в период беременности, однако отсутствуют описания развития патологических изменений структуры головного мозга на протяжении постнатального онтогенеза. Такие исследования необходимы, поскольку изменения в раннем онтогенезе во многом обусловлены следовым воздействием повышенного уровня гомоцистеина, в то время как в более поздний период развиваются отсроченные последствия нарушения онтогенетического развития головного мозга. Поэтому в коре и гиппокампе крысят было проведено структурное и ультраструктурное исследование, а также проанализированы

молекулярные маркеры нейровоспалительного ответа для выявления возможных причин поведенческих изменений после ПГГЦ.

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 [1]. Размер выборок потомства нормальных самок и самок, перенесших ГГЦ, составлял по 10 животных на каждую возрастную стадию.

Исследовалось влияние ПГГЦ на структурную и ультраструктурную организацию нервной ткани, изменения нейронов и глиальных клеток в теменной области коры, а также в поле CA1 дорсального гиппокампа головного мозга потомства. Для микроскопического исследования отбирали полушария мозга крысят на P5 (сразу после нормализации уровня ГЦ в крови и мозге потомства), на P20 (критический период для развития кортикальной пластинки мышевидных грызунов) и на взрослой стадии (P90), когда мозг полностью сформирован. Ткань мозга фиксировали 10%-м нейтральным формалином на фосфатном буфере (PBS, pH 7.4), замороженные фронтальные срезы толщиной 20 мкм изготавливали на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Germany). Для светооптического исследования отбирали срезы (3.50 mm в каудальном направлении от линии Bregma), окрашенные крезилвиолетом по Нисслю. С помощью микроскопа ImagerA (Zeiss, Germany) оценивали состояние нейронов. Другие срезы отбирали для иммуногистохимического исследования распределения нейрональных и глиальных маркеров. Нейрональный маркер Fox3 (NeuN), экспрессирующийся только в живых, нормально функционирующих нейронах, определяли при помощи непрямого иммунофлуоресцентного анализа. Использовали выработанные в кролике первичные антитела: к нейрональному маркеру NeuN (Fox3, разведение 1:200), маркеру астроцитарной глии глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP 1:200) и маркеру микроглии Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule; 1:100) производства AbCam (UK). Визуализацию первичных антител к Fox3 или GFAP проводили FITC-конъюгированными (разведение 1:200) или фикоэритрин-конъюгированными вторичными антителами к IgG кролика (1:200). Иммунофлуоресцентное исследование выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия).

Возбуждение флуорохромов проводили He/Ar лазером при длине волн 488 нм. Флуоресцентный сигнал FITC наблюдали в диапазоне длин волны 496–537 нм, фикоэритрин – при 652–690 нм. При проведении анализа клеточного состава ткани использовали программу «Видеотест Мастер-Морфология» (ВидеоТест, Россия). На участке теменной коры или поля CA1 гиппокампа шириной 500 мкм, включающем все слои, подсчитывали количество NeuN-позитивных, GFAP-позитивных и Iba1-позитивных клеток. Для каждого животного вычисляли средние величины по 10-и исследованным срезам и использовали их в статистическом анализе.

На те же сроки постнатального онтогенеза (n=4 в каждой группе) проводили электронномикроскопическое исследование. Ткань фиксировали методом транскардиальной перфузии смесью 1%-го глютарового альдегида и 1%-го формальдегида на 0,1 M PBS, pH 7.4, дофиксировали 1%-м OsO_4, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в аралдит по стандартному протоколу. На ультратоме LKB-III (LKB, Sweden) изготавливали ультратонкие срезы толщиной 500 Å, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, USA).

Ткань коры мозга, либо гиппокампа гомогенизировали в 1:3 (мас./об.) 0,01 M PBS (pH 7.4). Гомогенат центрифугировали при 16 000 g в течение 20 мин, в анализах использовали надосадочную жидкость. Уровни IL-1β и IL-6 в гиппокампе определяли с помощью высокочувствительного иммуноферментного анализа (ИФА) у крыс с использованием имеющихся в продаже наборов в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems, США). Уровень IL-10 анализировали с помощью набора ИФА (ООО «Цитокин», Россия), строго следуя инструкциям производителя. Содержание этих цитокинов измеряли с помощью оптической денситометрии при 450 нм в микропланшетном ридере (ELx800, BioTek Instuments, США).

Результаты и обсуждение

Иммунохимическое окрашивание нейронального маркера NeuN выявило снижение числа жизнеспособных кортикальных и гиппокампальных нейронов в первый месяц после рождения крысят. У ПГГЦ крысят оно составляло для гиппокампа 65,3% от уровня контроля на P5 (Mann-Witney U test, $p \leq 0{,}01$) и 47,1% на P20 ($p \leq 0{,}001$), а для теменной коры 23,8 ($p \leq 0{,}05$), и 39,2% ($p \leq 0{,}01$), соответственно. ПГГЦ вызывала увеличение количества астроглиальных (GFAP-позитивных) и микроглиальных (Iba1-позитивных) клеток. На P5 количество астроцитов в теменной коре

крысят с ПГГЦ было в 2,09 раз выше уровня контроля (Mann-Witney U test $p \leq 0{,}001$), а на P20 оно поднималось в 2,41 раз выше уровня контроля (Mann-Witney U test $p \leq 0{,}001$), а для гиппокампа оно составляло 2,1 и 2,3. Количество микроглиальных клеток в CA1 гиппокампана P5 не отличалось от уровня контроля, однако на P20 оно превышало уровень контроля в 3,28 раз (Mann-Witney U test $p \leq 0{,}001$). Для теменной коры количество микроглиальных клеток при ГГЦ было в 2,9 (на P5) или 3,2 раза (на P20) выше чем у контроля. На P90 статистически значимого различия в клеточном составе исследованных отделов мозга между контрольной и ПГГЦ группами выявлено не было. С помощью иммуноферментного анализа у 20-суточных ПГГЦ крысят было выявлено 1,5-кратное повышение уровня провоспалительных цитокинов IL-1β (в коре и гиппокампе, Student's t-test $p \leq 0.05$) и IL-6 (в гиппокампе, Student's t-test $p \leq 0.05$) на фоне 25%-го снижения уровня антивоспалительного цитокина IL10 (в гиппокампе, Student's t-test $p \leq 0.05$).

Гибель нейронов и глиоз в ткани гиппокампа и коры мозга крысят, перенесших ПГГЦ, были описаны в наших публикациях [2; 3]. Известно, что астроциты и микроглия способны реагировать на различные изменения в окружающей среде путем активации и миграции в пораженные области [4]. Индукция реактивного состояния астроцитов и активация микроглии может происходить из-за повреждения нейронов, нейродегенерации или в ответ на воспаление [5]. Вместе с тем, активация астроцитов возникает благодаря взаимодействию с микроглией в ответ на продуцируемые ей цитокины, такие как IL-1β. Известно, что активированная астроглия способна продуцировать про- и противовоспалительные цитокины подобно активированной микроглии [5], что способствует лавинообразному усилению активации глиальных элементов и формированию обширного глиоза, подобного тому, который наблюдался нами как в коре, так и в гиппокампе мозга крысят после ПГГЦ. Судя по всему, в ходе взросления нейровоспалительные процессы в коре и гиппокампе затухают и к P90 мы не могли их наблюдать напрямую.

С помощью электронной микроскопии в гиппокампе P5 крысят, перенесших ПГГЦ, были обнаружены деструктивные изменения в ультраструктуре нервной ткани, которые выражались в появлении большого количества аутофагосом, чего не наблюдалось у контрольной группы этого возраста. Скопления аутофагосом выявлялись в основном в нейропиле гиппокампа в мелких и крупных дендритных отростках. Иногда аутофагосомы находили в цитоплазме тел нейронов вблизи от цистерн эндоплазматического ретикулума

(ЭПР). В центре этих областей были заметны тёмные гранулированные скопления разной величины. Они отделены от окружающей их цитоплазмы мембраной. Количество аутофагосом в гиппокампе ПГГЦ крысят было намного выше, чем в исследованных областях новой коры. К Р20 такие гранулированные скопления и аутофагосомы встречаются реже, чем у более молодых животных, к взрослой стадии развития они наблюдаются крайне редко.

Также на Р5 и Р20 в ткани коры мозга в группе с ПГГЦ было отмечено увеличение количества лизосом в телах и отростках нейронов в коре мозга и гиппокампе, а также расширение каналов шероховатой ЭПР и увеличение количества свободных полисом в цитоплазме клеточного тела и крупных отростков нейронов, характерные преимущественно для ткани коры мозга, а в гиппокампе выражены значительно слабее. Наши данные согласуются с сообщениями других авторов о том, что гомоцистеин вызывает появление вздутых нейронов с гипертрофически увеличенными каналами ЭПР, а также накопление рибосом в цитоплазме и потерю других органоидов [6]. Однако столь подробного исследования ультраструктуры ткани мозга крыс с ПГГЦ в возрастной динамике ранее не проводилось.

Результаты проведённого исследования свидетельствуют о наличии возрастной динамики формирования патологических структурных нарушений у крыс с ПГГЦ. Наиболее сильные различия между группами наблюдались в первый месяц постнатального онтогенеза. Патогенез на Р5 в значительной степени может определяться следовым воздействием гомоцистеина, уровень которого нормализуется к этому сроку. Усиление гибели нейронов и глиоза к Р20 связано с развитием нейровоспалительных процессов, о чём свидетельствует изменение уровня провоспалительных цитокинов как в коре, так и в гиппокампе. В ходе дальнейшего взросления животных последствия нейровоспалительных процессов и нейрональной гибели сглаживаются, но в ткани остаются клетки, демонстрирующие признаки дегенерации.

Исследования выполнены в рамках проекта РФФИ № 20-015-00388, и государственного задания №075-00408-21-00 (гистологические исследования) и 1021062812133-0-3.2.2 (иммуноферментный анализ).

Этические положения. 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.

Литература

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, V. 85 P. 248–259;
2. 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, V. 10: 1536
3. 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
4. Daginakatte G, Gadzinski A., Emnett R., Stark J., Gonzales E., Yan P., Lee J-M., Cross C., Gutmann D. Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines // Exp Neurol., 2008, V. 210 №1 P. 261-267
5. Voet S, Prinz M., van Loo G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology // Trends Mol Med., 2019, V. 25 №2 P. 112-123
6. Schweinberger, B.M., Rodrigues, A.F., dos Santos, T.M. Methionine Administration in Pregnant Rats Causes Memory Deficit in the Offspring and Alters Ultrastructure in Brain Tissue// Neurotox Res., 2018, V. 33 P. 239-246

© Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Щербицкая А.Д.,
Милютина Ю.П., Арутюнян А.В., 2022

УДК: 611.813.14.018:599.323.4
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.7

ФАКТОРЫ РИСКА ОСТРЫХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

© Габдулвалеева Э.Ф.*, Адзитарова А.Р.
ФБУН Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, г. Уфа
amerovaef@mail.ru

Аннотация. Приведены результаты анализа факторов риска возникновения острых нарушений мозгового кровообращения. При острой ишемии мозга пол и возраст проанализированы в зависимости от стадии болезни, что имело глобальное значение для определения прогноза. Проведенные исследования показали, что малый ишемический инсульт встречался преимущество у мужчин (37 чел.), пик болезни приходился на возраст 40-45 лет (37,8%). При «псевдоинсульте» преимущество также составляли мужчины (51 чел). пик болезни приходился на возраст после 45 лет (49,0%), т.е. сохранялись те же закономерности. Значительно увеличивался рост заболевших при псевдоинсульте как у мужчин (49,0%), так и женщин (40,8%) после 45 лет. При малом инсульте пик болезни приходился на возраст 40-45 лет: у мужчин (37,8%), у женщин (57,1%). При острой ишемии мозга преобладали служащие - 40,5%. Рабочие составляли 23,4%, фермеры - 7,6%, пенсионеры - 5,7%, домохозяйки - 3,2%, инвалиды - 19,6%. Следовательно, по профессиональному составу во всех исследуемых группах преобладали служащие. Рабочие и сельские жители имели практически равные доли, однако, в группе с острой ишемией мозга по типу «псевдоинсульта» отмечался устойчивый рост к инвалидности. При анализе длительности процесса отмечалось увеличение роста заболеваемости больных свыше 10 лет (55 чел.), преимущество составляли женщины (39 чел.) в возрасте от 40 до 45 лет (48,7%). Длительность до 5 лет отмечена у 53 чел., преимущество составили женщины (31 чел.) в возрасте от 30 до 39 лет (41,9%). При течении болезни от 5 до 10 лет в основном преобладали мужчины 29 человек в возрасте от 40 до 45 лет (37,9%). Выявлена роль факторов: пола, возраста, соматических заболеваний и характера трудовой деятельности.

Ключевые слова: экология человека, факторы риска, острые нарушения мозгового кровообращения, псевдоинсульт, острая ишемия мозга

RISK FACTORS FOR ACUTE CEREBRAL CIRCULATORY DISORDERS

Gabdulvaleeva E.F.*, Adzitarova A.R.
Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa
amerovaef@mail.ru

Abstract. The results of the analysis of risk factors for acute disorders of cerebral circulation are presented. In acute cerebral ischemia, gender and age were analyzed depending on the stage of the disease, which was of global importance for determining the prognosis. Studies have shown that minor ischemic stroke occurred mainly in men (37 people), the peak of the disease occurred at the age of 40-45 years (37.8%). Men (51 people) also had the advantage in "pseudo-stroke". the peak of the disease occurred after the age of 45 (49.0%), i.e. the same patterns remained. There was a significant increase in the incidence of pseudoinsult in both men (49.0%) and women (40.8%) after 45 years. With a small stroke, the peak of the disease occurred at the age of 40-45 years: in men (37.8%), in women (57.1%).

In acute cerebral ischemia, employees predominated - 40.5%. Workers made up 23.4%, farmers - 7.6%, pensioners - 5.7%, housewives - 3.2%, disabled people - 19.6%. Consequently, according to the professional composition, employees prevailed in all the studied groups. Workers and rural residents had almost equal shares, however, in the group with acute cerebral ischemia of the "pseudo-stroke" type, there was a steady increase in disability. When analyzing the duration of the process, there was an increase in the incidence of patients over 10 years (55 people), the advantage was women (39 people) aged 40 to 45 years (48.7%). Duration up to 5 years was noted in 53 people, the advantage was women (31 people) aged 30 to 39 years (41.9%). During the course of the disease from 5 to 10 years, 29 men aged 40 to 45 years (37.9%) mainly prevailed. The role of factors is revealed: gender, age, somatic diseases and the nature of labor activity.

Keywords: human ecology, risk factors, acute cerebral circulatory disorders, pseudoinsult, acute cerebral ischemia

Введение

Проблема цереброваскулярной патологии, обусловленная острой ишемией головного мозга, из-за большой распространенности и тяжести осложнений представляет в настоящее время медицинское и социальное значение не только в России, но и во всём мире [7]. В

нашей стране показатели смертности населения от сосудистых заболеваний мозга занимают второе место, уступая только ишемической болезни сердца [1, 6, 8]. Ежегодно в России переносят острое нарушение мозгового кровообращения более 450 тысяч, летальность при которых достигает 35% [2]. По данным литературы одним из доминирующих факторов риска возникновения тяжелой патологии мозга, приводящей к инвалидизации и смертности населения, является ишемический инсульт [3].

Для организации профилактических мероприятий большую роль играет изучение факторов риска, анализу которых посвящена данная работа.

Материалы и методы

Нами проведены клинико-физиологические исследования 158 больных с острой ишемией головного мозга. Для контроля взята группа из 30 практически здоровых лиц обоего пола в возрасте основной исследуемой группы.

Научная работа проводилась в неврологической клинике Института повышения квалификации Федерального Управления медико-биологических и экстремальных проблем при МЗ РФ. Динамика заболевания была прослежена на протяжении 2 лет, либо путем повторной госпитализации (73), либо катамнестически (85).

В работе использовалась классификация сосудистых поражений головного мозга, основанная на клинических критериях, предложенная в 1971 году Е.В. Шмидтом и Г.А. Максудовым, которая в последующем дополнена Н.В. Верещагиным с соавт. (1977), Е.И. Гусевым с соавт. (1985), Е.М. Бурцевым с соавт. (1993).

Диагноз ишемического инсульта устанавливали на основании оценки анамнеза, клинической картины заболевания, данных компьютерной (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ), дополнительных клинико-лабораторных и инструментальных обследований.

Острое начало, общемозговые и очаговые симптомы, данные дополнительных методов исследования позволяли установить локализацию ишемического инсульта, которая затем подтверждалась визуализирующими методами исследования. Все пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от данных КТ или МРТ исследования. При КТ или МРТ исследовании у 100 (мужчин -51, женщин -49) больных на томограммах не было обнаружено очаговых изменений. По данным литературы изменения при КТ мозга могут отсутствовать у больных с очень небольшим очагом в белом веществе

полушарий мозга или подкорковых ядрах - диаметром меньше 0,5 см; при небольшом корковом очаге - диаметром менее 1-2 см: при небольшом очаге в стволе мозга [4, 5, 13]. Эта группа больных рассматривалась как больные с «псевдоинсультом» (с очень малым очагом ишемии мозга) и была обозначена термином - КТ негативный ишемический инсульт.

У 58 (мужчин - 37, женщин - 21) больных обнаружены очаговые изменения на томограммах от 5 до 15 мм в диаметре, средний размер- 10,5 ± 0,7х8,4 ± 0,8 мм (у мужчин 10,1 ± 8,7х8,7 ± 1,1; у женщин 11,1 ± 0,6х7,9 ± 0,05), они были отнесены к малому инсульту (МИ).

С целью объективной диагностики сосудистых поражений головного мозга была разработана адаптированная история болезни, позволяющая провести быструю обработку данных; включающая в себя: подробные жалобы больного, нарастание их, выраженность и периодичность; анамнез заболевания с учетом последовательности и динамики развития всех симптомов; анамнез жизни, время наступления болезни, ее длительность, дебют. Подробно указаны провоцирующие факторы, наследственность (повышение АД и наличие сердечно-сосудистых расстройств у ближайших родственников), особенности течения процесса, клинические проявления заболевания: интенсивность, частота, качество неврологических жалоб, предвестники и время возникновения острой ишемии головного мозга.

Для более точного анализа клинического материала нами были разработаны карты в виде анкет - опросников, включающих в себя: критерий уровня АД, подробные жалобы больного, эффект от проводимой терапии, субъективное исследование факторов риска, вопросы психической и физической адаптации. Особое внимание уделялось факторам, влияющим на прогрессирование заболевания и ухудшающим состояние пациента.

Результаты и обсуждение

При острой ишемии мозга пол и возраст проанализированы в зависимости от стадии болезни, что имело глобальное значение для определения прогноза. Проведенные исследования показали, что малый ишемический инсульт встречался преимущество у мужчин (37 чел.), пик болезни приходился на возраст 40-45 лет (37,8%). При «псевдоинсульте» преимущество также составляли мужчины (51 чел.), пик болезни приходился на возраст после 45 лет (49,0%), т.е. сохранялись те же закономерности. Значительно увеличивался рост заболевших при псевдоинсульте как у мужчин (49,0%), так и женщин

(40,8%) после 45 лет. При малом инсульте пик болезни приходился на возраст 40-45 лет: у мужчин (37,8%), у женщин (57,1%).

При острой ишемии мозга преобладали служащие - 40,5%. Рабочие составляли 23,4%, фермеры - 7,6%, пенсионеры - 5,7%, домохозяйки - 3,2%, инвалиды - 19,6%. Следовательно, по профессиональному составу во всех исследуемых группах преобладали служащие. Рабочие и сельские жители имели практически равные доли, однако, в группе с острой ишемией мозга по типу «псевдоинсульта» отмечался устойчивый рост к инвалидности.

При анализе длительности процесса отмечалось увеличение роста заболеваемости больных свыше 10 лет (55 чел.), преимущество составляли женщины (39 чел.) в возрасте от 40 до 45 лет (48,7%). Длительность до 5 лет отмечена у 53 чел., преимущество составили женщины (31 чел.) в возрасте от 30 до 39 лет (41,9%). При течении болезни от 5 до 10 лет в основном преобладали мужчины 29 человек в возрасте от 40 до 45 лет (37,9%).

Анализируя полученные результаты по полу, возрасту и длительности заболевания, отмечались следующие закономерности:

1. В молодом возрасте при малом инсульте пол и возраст практически не взаимосвязаны. При «псевдоинсульте» преимущественно страдают мужчины. Отмечена устойчивая тенденция к росту заболевания в «критическом» возрасте (40-45 лет), на который приходился пик подъема болезни, как у мужчин, так и у женщин.

2. Очаги ишемии встречались в области Варолиева моста (у 6 из 13) и продолговатого мозга (у 1 из 13) только при малом инсульте. Малый инсульт в области мозжечка отмечался в 2 и в затылочной доле в 4 из 13 случаев. Средние очаги ишемии отмечались в мозжечке у 3 из 4 и затылочной доле у 1 из 4. Большие очаги ишемии в мозжечке встречались у 3 из 12 и в затылочной доле у 9 из 12 больных. Малый инсульт в вертебробазилярном бассейне незначительно чаше отмечался у мужчин.

Результаты собственных исследований позволили выявить факторы риска характерные для псевдоинсульта: - возраст до 60 лет, артериальная гипертония, хронические заболевания ЖКТ, аппендэктомия в анамнезе, хронические гинекологические заболевания у женщин, черепно-мозговая травма в анамнезе. О влиянии возраста и артериальной гипертонии при ишемическом инсульте имеется много публикации [14], но отсутствуют сообщения об этих факторах при псевдоинсульте. По нашим данным пссвдоинсульт встречался чаще в молодом возрасте, у больных с артериальной гипертонией, без признаков атеросклероза. Хронические заболевания ЖКТ,

необязательно в активной стадии, могут являться причиной ишемического инсульта, их связь опосредуется через тромбоцитоз, гиперкоагуляцию, малую подвижность, васкулит и дегидратацию [11].

По мнению ряда авторов [8, 10] высоким фактором риска ПИ являются кардиальные и каротидные микроэмболии, в то время как другие учёные [9, 12] отмечают эту причину очень редко. При КТ ПИ одни авторы отмечали, что они по форме и размерам похожи друг на друга, другие описывали ПИ как расширенное периваскулярное пространство [7].

По нашим данным при псевдоинсульте сохраняется у многих больных нормальная ЭКГ, почти не встречается мерцательная аритмия. Проведенное исследование некоторых биохимических, гемостазиологических показателей крови показал, что изменения уровня бета - липопротеидов, некоторых показателей гемостазиограммы могут изменяться в зависимости от размеров очага ишемии головного мозга и могут зависеть от фактора пола. Так высокое содержание бета - липопротеидов в крови может способствовать поражению мелких сосудов головного мозга и нарушению микроциркуляции на этом уровне, способствуя развитию псевдоинсульта или малого инсульта. Повышение глюкозы крови способствует нарастанию гиперкоагуляции при ишемическом инсульте, видимо более ярко это проявляется у лиц женского пола. Изменение некоторых показателей свертывающей системы крови в сторону гиперкоагуляции (АЧТВ, ОФН-тест, этаноловый и протаминсульфатный тесты, агрегация тромбоцитов и ПДФ) имели прямую зависимость от типа и характера процесса. Обнаружены изменения бета - липопротеидов, некоторых показателей коагулограммы в зависимости от размеров очага ишемии головного мозга и пола больных. Так повышение бета - липопротеидов отмечалось при исевдоинсульте и малом инсульте у лиц обоего пола ($p<0,05$), но сильнее у женщин ($p<0,001$). Повышение уровня глюкозы также было достоверно выше у женщин ($p<0,05$), чем у мужчин. Снижение уровня гемоглобина было выражено сильнее у мужчин ($p<0,05$), чем у женщин. Гиперкоагуляция по АЧТВ была выражена сильнее у женщин ($p<0,05$), чем у мужчин, а по агрегации тромбоцитов, наоборот, была выше у мужчин, чем у женщин ($p<0,001$).

Литература

1. Анохин П.К. Очерки по физиологии функциональных систем. М.: Медицина. 1975.-447 с.

2. Баркаган З.С. Клинико-патогенетические варианты, номенклатуры и основы диагностики гематогенных тромбофилий. // Пробл. гематологии и переливания крови.-1996.-№ 3.-С. 5-15.
3. Гасанов Р.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Ночные мозговые инсульты // Материалы 8 Всероссийского съезда неврологов.-Казань. 2001.-С. 218.
4. Гусев Е.И., Бурд Г.С., Скворцова В.И. Дифференциальная терапия церебральных инсультов // Вестник практической неврологии.-1995.-№ 1.-С. 8-14.
5. Ерохина Л.Г., Чекнева Н.С., Стаховская Л.В. Современные аспекты клиники и патогенеза псевдоинсульта при острой соматической патологии // Неврологический журнал.-1992.- № 2.-С. 19-22.
6. Лакунарный инфаркт-особая форма очаговой сосудистой патологии головного мозга при артериальной гипертонии // Н.В. Верещагин, В.А. Моргунов, Л.А. Калашникова и др. // Журнал невропатологии и психиатрии.-1983.-№ 7.-С. 1015-1021.
7. Федин А.И. Энергетический обмен в головном мозге у больных с тяжелым инсультом // Сосудистые заболевания нервной системы.-М., 1983.-С. 187-190.
8. Хак А.М. Изучение механизмов развития цереброваскулярных расстройств при остром повышении артериального давления: (экспериментальные и клинические исслед.) Дисс… к.м.н.-М., 1992.-190 с.
9. Шмидт Е.В. Сосудистые заболевания нервной системы.- М.: Медицина, 1975.-663 с.
10. Яхно Н.Н., Штульман Д.Р., Мельничук П.В. Болезни нервной системы.-М., 1995.-Т. 1.-656 с.
11. Bamford J.M. The classification and natural history of acute cerebrovascular disease // M.D.thesis, University of Machester. -1986.
12. Chen J., Weinstein P.R., Gracham S.H. Attenuation of postischemic brain hypoperfusion and reperfusion injury by the cyclooxygenase-lipogcnase inhibitor BW 755 C // J. Neurosurg. - 1995. -Vol.83, №l. -P.99-104.
13. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. / G.A. Colditz, W.C. Willett, M.J. Stampfer et. al. // N. Engl. J. Med. -1987. -Vol.316. -P. 1105-1110.
14. Poirier J., Derouesne C. Cerebral Lacunae. A proposed new classification // Clin. Neuropalhol. -1984. Vol.3. -P.226.

© Габдулвалеева Э.Ф., Адзитарова А.Р., 2022

УДК: 316.625:575.162
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.8

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ В САМОРЕГУЛЯЦИИ ПОВЕДЕНИЯ У ПСИХИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДОВ

© Давыдова Ю.Д.[1,2]*, Казанцева А.В.[1,2,3], Еникеева Р.Ф.[1,2], Мустафин Р.Н.[2,4], Лобаскова М.М.[5], Тахирова З.Р.[2], Малых С.Б.[5], Хуснутдинова Э.К.[1,2]

[1] Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа

[2] Башкирский государственный университет, г. Уфа

[3] Уфимский государственный нефтяной технический университет, г. Уфа

[4] Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

[5] Психологический институт Российской академии образования, г. Москва

* julia.dmitrievna@list.ru

*Аннотация. Саморегуляция представляет собой способность контролировать свое поведение, эмоции и мысли для достижения долгосрочных целей. Предполагается, что индивидуальные различия в системе саморегуляции возникают ввиду сложных взаимодействий между средовыми и наследственными факторами, среди которых ключевая роль отводится нарушениям нейромедиаторного обмена в головном мозге, однако генетические механизмы, лежащие в его основе, до сих пор не ясны. Целью данного исследования является оценка основного эффекта полиморфных локусов генов моноаминергических систем (SLC6A4 (5-HTTLPR и rs1042173), HTR2A (rs7322347), HTR1B (rs13212041), DRD4 (rs1800955)), а также ген-средовых взаимодействий в формировании индивидуальных различий в системе саморегуляции поведения у 692 психически здоровых индивидов с учетом половой и этнической принадлежности. В результате статистического анализа была выявлена ассоциация аллеля rs1800955*C гена DRD4 с повышенными показателями по шкале оценивания результатов в этнической группе удмуртов (β = 0.53; P = 0.005; P_{FDR} = 0.03). Кроме того, выявлен модулирующий эффект таких факторов, как «состав семьи (неполная семья)», «жестокое обращение в детстве» и «табакокурение» в случае*

ассоциации полиморфных локусов 5-HTTLPR, rs1800955, rs13212041 с индивидуальными различиями в системе саморегуляции поведения (P_{FDR} < 0.03).

Ключевые слова: саморегуляция, генетика поведения, нейромедиаторы, ген-средовые взаимодействия.

THE ROLE OF MONOAMINERGIC SYSTEM GENE POLYMORPHISMS IN SELF-REGULATION OF BEHAVIOR IN MENTALLY HEALTHY INDIVIDUALS

Davydova Yu.D.[1,2]*, Kazantseva A.V.[1,2,3], Enikeeva R.F.[1,2], Mustafin R.N.[2,4], Lobaskova M.M.[5], Takhirova Z.R.[2], Malykh S.B.[5], Khusnutdinova E.K.[1,2]

[1] Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

[2] Bashkir State University, Ufa, Russia

[3] Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, Russia

[4] Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

[5] Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Moscow, Russia

* julia.dmitrievna@list.ru

Abstract. Self-regulation is the ability to control one's behavior, emotions, and thoughts in the pursuit of long-term goals. It's assumed that individual differences in a system of self-regulation arise from complex interactions between environmental and hereditary factors, that may be linked to abnormal functioning of neurotransmitter systems in the brain yet the underlying genetic mechanisms remain unclear. The present study aimed to assess the main effects of monoaminergic systems gene polymorphisms (SLC6A4 (5-HTTLPR and rs1042173), HTR2A (rs7322347), HTR1B (rs13212041), DRD4 (rs1800955)) and gene-environmental interactions on individual differences in a system of self-regulation of behavior in 692 mentally healthy individuals with sex and ethnicity inclusion as covariates. Statistical analysis revealed the association of DRD4 rs1800955 C-allele with an increased scores on the results evaluation scale in Udmurts (β = 0.53; P = 0.005; P_{FDR} = 0.03). In addition, we revealed that «family content (incomplete family)», «maltreatment» and «smoking» significantly affected association of 5-HTTLPR, rs1800955, rs13212041 and individual differences in a system of self-regulation of behavior (P_{FDR} < 0.03).

Keywords: self-regulation, behavioral genetics, neurotransmitters, gene-environmental interactions.

Введение

Одной из важнейших особенностей адаптивного поведения человека и потенциальной копинг-стратегией при решении стрессовых жизненных ситуаций является способность индивида модифицировать систему саморегуляции (способность к изменению поведения в соответствии с широким спектром социальных и ситуативных требований) в ответ на динамичные условия социальной среды [1]. Недостаточный уровень сформированности некоторых структурных элементов процесса саморегуляции может приводить к снижению когнитивного функционирования, что обуславливает низкую продуктивность учебной деятельности, к дисгармонизации Я-концепции личности и снижению качества жизни индивида [2]. При этом, по мнению Моросановой В.И., процессы саморегуляции могут устойчиво проявляться в поведении и практической деятельности индивида, что говорит о формировании индивидуальных стилевых особенностей саморегуляции поведения [3].

Классическая система саморегуляции поведения человека включает в себя следующие звенья: 1) планирование – особенность целеполагания и степень сформированности у человека осознанного планирования деятельности; 2) моделирование – развитость представлений о внешних и внутренних значимых условиях, степень их детализованности и адекватности; 3) программирование – развитость осознанного программирования индивидом своих действий; 4) оценивание результатов – адекватность оценки индивидом себя и результатов своей деятельности; 5) гибкость – способность перестраивать поведение в ответ на изменение внешних и внутренних условий; 6) самостоятельность – развитость регуляторной автономности. Совокупность данных характеристик позволяет оценить общий уровень саморегуляции поведения индивида – степень сформированности его индивидуальной системы осознанной саморегуляции произвольной деятельности [1]. Существуют предположения, что с особенностями саморегуляции связан целый ряд поведенческих отклонений и психических расстройств, включая употребление психоактивных веществ, антисоциальное и агрессивное поведение, синдром дефицита внимания и гиперактивности, имеющих общую генетическую природу [4]. При этом, одна из ключевых ролей в формировании эмоциональных характеристик человека как в норме, так и при патологии, отводится генам моноаминергических систем. Среди таковых: ген переносчика серотонина (*SLC6A4*, 17q11.2), гены рецепторов серотонина (*HTR2A*, 13q14.2; *HTR1B*, 6q14.1) и дофамина (*DRD4*, 11p15.5), являющиеся наиболее популярными генами-

кандидатами при изучении поведенческих особенностей [5]. Учитывая гипотезу универсальных генов (universalist genes hypothesis) [6], можно предположить, что гены-кандидаты психических расстройств, упомянутых ранее, могут также рассматриваться и в качестве генов-кандидатов, определяющих стилевые особенности саморегуляции поведения человека. Таким образом, целью настоящего исследования является оценка основного эффекта полиморфных локусов генов моноаминергических систем (*5-HTTLPR* и *rs1042173* гена *SLC6A4*, *rs7322347* гена *HTR2A*, *rs13212041* гена *HTR1B*, *rs1800955* гена *DRD4*), а также ген-средовых взаимодействий в формировании индивидуальных различий в системе саморегуляции поведения.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 692 индивида (80.64% женщин) без наследственной отягощенности психическими заболеваниями (средний возраст 20.25 ± 1.83 лет), из них: татар – 223, русских – 207, удмуртов – 128, метисов – 134.

От всех участников было получено добровольное согласие на участие в данном исследовании. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием индивидов, соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Все участники прошли анкетирование, учитывающее ряд параметров социального характера, включая национальную принадлежность до трех поколений, порядок рождения и количество детей в семье, уровень доходов, статус курения и др. Для определения стилевых особенностей саморегуляции поведения был использован опросник «Стиль саморегуляции поведения» (ССП-98) Моросановой В.И., состоящий из 46 утверждений, позволяющих оценить общий уровень саморегуляции, а также особенности планирования, моделирования, программирования, оценки результатов, а также гибкости и самостоятельности.

В качестве материала для исследования служили образцы ДНК, выделенные из венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции.

Генотипирование полиморфных локусов *rs1042173*, *rs7322347*, *rs13212041*, *rs1800955* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией (FLASH/RTAS, ФГУП «ГосНИИгенетика», г. Москва) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) с возможностью проведения анализа флуоресценции по

конечной точке. Генотипирование полиморфного локуса *5-HTTLPR* проводили методом ПЦР («Синтол», Россия) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США), с последующим электрофоретическим разделением фрагментов в 7% полиакриламидном геле.

Статистическая обработка данных включала множественный линейный/логистический регрессионный анализ с FDR-коррекцией (False Discovery Rate, поправка Бенджамини и Хохберга) на множественность сравнений (PLINK v. 1.9).

Результаты и обсуждение

Наблюдаемые частоты генотипов полиморфных локусов генов *SLC6A4* (*5-HTTLPR*, *rs1042173*), *HTR2A* (*rs7322347*), *HTR1B* (*rs13212041*) и *DRD4* (*rs1800955*) соответствовали ожидаемым при равновесии Харди-Вайнберга ($P > 0.05$).

В результате линейного регрессионного анализа не было выявлено ассоциации полиморфных локусов *5-HTTLPR*, *rs1042173*, *rs7322347*, *rs13212041* и *rs1800955* с вариациями общего уровня саморегуляции, моделирования и самостоятельности во всех исследуемых группах (мужчины, женщины, индивиды русской, татарской, удмуртской этнических принадлежностей) ($P > 0.05$).

При анализе вариаций показателей планирования была выявлена ассоциация аллеля *5-HTTLPR*L* гена переносчика серотонина *SLC6A4* с пониженными показателями по шкале планирования в группе женщин ($\beta = -0.24$; $P = 0.02$; $P_{FDR} = 0.14$) и этнической группе удмуртов ($\beta = -0.62$; $P = 0.02$; $P_{FDR} = 0.15$), однако данная тенденция не достигла уровня статистической значимости после FDR-коррекции ($P_{FDR} > 0.05$) (табл. 1).

Табл. 1. Результаты анализа ассоциаций полиморфных локусов генов моноаминергических систем с вариациями показателей по шкале планирования.

Полиморфный локус (минорный / мажорный аллель)	Показатель	Общая выборка (N = 692)	Женщины (N = 558)	Мужчины (N = 134)	Русские (N = 207)	Татары (N = 223)	Удмурты (N = 128)
5-HTTLPR (L/S)	β	-0.20	-0.24	-0.45	-0.25	-0.09	-0.62
	P	0.051	**0.02**	0.10	0.21	0.61	**0.02**
	P_{FDR}	0.31	0.14	0.29	0.62	0.85	0.15
rs1042173 (G/T)	β	-0.08	-0.08	-0.08	-0.18	0.02	-0.19
	P	0.44	0.48	0.77	0.41	0.88	0.51
	P_{FDR}	0.69	0.72	0.94	0.62	0.88	0.72
rs7322347 (A/T)	β	0.11	0.12	0.03	0.24	0.14	0.36
	P	0.37	0.35	0.92	0.31	0.46	0.21
	P_{FDR}	0.69	0.69	0.94	0.62	0.85	0.42
rs13212041 (C/T)	β	-0.01	0.05	-0.28	0.18	-0.10	0.14
	P	0.92	0.76	0.41	0.52	0.64	0.69
	P_{FDR}	0.92	0.76	0.82	0.62	0.85	0.72
rs1800955 (C/T)	β	-0.05	0.05	-0.46	-0.01	-0.20	-0.10
	P	0.64	0.68	0.06	0.96	0.21	0.72
	P_{FDR}	0.76	0.76	0.29	0.96	0.85	0.72

Примечание. β – коэффициент регрессии; P – P-value; P_{FDR} – P-value после FDR-коррекции. Статистически значимые различия (до или после FDR-коррекции) выделены полужирным шрифтом.

Как известно, ген переносчика серотонина *SLC6A4* имеет несколько полиморфных локусов, связанных с дифференциальной экспрессией гена. Одним из таковых является инсерционно-делеционный полиморфизм *5-HTTLPR*, который может нести вставку размером 44 п.н. в 5’-регуляторной области гена (аллель **L*), функционально проявляющуюся в более высоком уровне экспрессии гена [5]. Ранее было показано, что носители аллеля *5-HTTLPR*L* более склонны к проявлению самонаправленной агрессии [7] и враждебности [8], что позволяет предполагать и снижение уровня саморегуляции поведения у индивида. Снижение средних показателей по шкале планирования, как компонента саморегуляции, свидетельствует о том, что у индивидов-носителей аллеля *5-HTTLPR*L* снижена потребность в планировании, а целеполагание выражено слабо или выдвигаемые цели стихийны и ситуативны [1].

Кроме того, в результате линейного регрессионного анализа была выявлена ассоциация аллеля *5-HTTLPR*L* с пониженными показателями по шкале программирования в общей выборке (β = -0.18; P = 0.04; P_{FDR} = 0.26) и в группе женщин (β = -0.25; P = 0.009; P_{FDR} = 0.057), однако данная тенденция также не достигла уровня статистической значимости после FDR-коррекции (P_{FDR} > 0.05) (табл. 2).

Табл. 2. Результаты анализа ассоциаций полиморфных локусов генов моноаминергических систем с вариациями показателей по шкале программирования.

Полиморф-ный локус (минорный / мажорный аллель)	Показатель	Общая выборка (N = 692)	Женщины (N = 558)	Мужчины (N = 134)	Русские (N = 207)	Татары (N = 223)	Удмурты (N = 128)
5-HTTLPR (L/S)	β	-0.18	-0.25	-0.08	<0.005	-0.14	-0.30
	P	**0.04**	**0.009**	0.71	0.99	0.42	0.18
	P_{FDR}	0.26	0.057	0.92	0.99	0.78	0.75
rs1042173 (G/T)	β	0.02	0.08	-0.31	-0.05	-0.14	0.20
	P	0.84	0.41	0.14	0.76	0.34	0.40
	P_{FDR}	0.96	0.82	0.42	0.91	0.78	0.75
rs7322347 (A/T)	β	0.08	0.12	-0.13	0.15	-0.07	0.22
	P	0.42	0.26	0.58	0.40	0.68	0.34
	P_{FDR}	0.83	0.79	0.92	0.79	0.78	0.75
rs13212041 (C/T)	β	-0.07	-0.03	-0.26	-0.10	-0.07	-0.18
	P	0.56	0.80	0.34	0.62	0.73	0.54
	P_{FDR}	0.83	0.82	0.69	0.91	0.78	0.75
rs1800955 (C/T)	β	-0.09	-0.03	-0.32	-0.30	-0.04	0.09
	P	0.29	0.73	0.11	0.08	0.78	0.67
	P_{FDR}	0.83	0.82	0.42	0.30	0.78	0.75

Примечание. β – коэффициент регрессии; P – P-value; P_{FDR} – P-value после FDR-коррекции. Статистически значимые различия (до или после FDR-коррекции) выделены полужирным шрифтом.

Низкие показатели по шкале программирования у носителей аллеля *5-HTTLPR*L* говорят о предпочтении действовать импульсивно, путем проб и ошибок [1], что в определенной степени согласуется с опубликованными ранее данными [5,7,8].

При анализе вариаций показателей оценивания результатов была выявлена ассоциация аллеля *rs1800955*C* гена рецептора дофамина

DRD4 с повышенными показателями по шкале оценивания результатов в этнической группе удмуртов (β = 0.53; P = 0.005; P_{FDR} = 0.03) (табл. 3).

Табл. 3. Результаты анализа ассоциаций полиморфных локусов генов моноаминергических систем с вариациями показателей по шкале оценивания результатов.

Полиморф-ный локус (минорный / мажорный аллель)	Показатель	Общая выборка (N = 692)	Женщины (N = 558)	Мужчины (N = 134)	Русские (N = 207)	Татары (N = 223)	Удмурты (N = 128)
5-HTTLPR (L/S)	β	-0.04	-0.03	-0.20	-0.22	0.04	-0.26
	P	0.63	0.74	0.38	0.14	0.80	0.18
	P_{FDR}	0.99	0.91	0.77	0.28	0.91	0.55
rs1042173 (G/T)	β	0.01	-0.07	0.36	-0.27	0.09	-0.02
	P	0.88	0.42	0.09	0.90	0.52	0.93
	P_{FDR}	0.99	0.84	0.53	0.28	0.91	0.93
rs7322347 (A/T)	β	0.001	0.007	-0.02	-0.16	0.10	0.10
	P	0.99	0.94	0.92	0.35	0.57	0.60
	P_{FDR}	0.99	0.94	0.98	0.52	0.91	0.90
rs13212041 (C/T)	β	0.02	0.04	-0.09	-0.12	0.02	-0.05
	P	0.85	0.76	0.75	0.55	0.91	0.84
	P_{FDR}	0.99	0.91	0.98	0.59	0.91	0.93
rs1800955 (C/T)	β	0.07	0.08	0.05	-0.09	0.10	0.53
	P	0.43	0.39	0.79	0.59	0.50	**0.005**
	P_{FDR}	0.99	0.84	0.98	0.59	0.91	**0.03**

Примечание. β – коэффициент регрессии; P – P-value; P_{FDR} – P-value после FDR-коррекции. Статистически значимые различия (до или после FDR-коррекции) выделены полужирным шрифтом.

Ген рецептора дофамина *DRD4* является одним из наиболее изучаемых генов-кандидатов дофаминергической системы при поведенческих расстройствах. В ряде мета-анализов была подтверждена связь локусов данного гена с риском развития целого спектра психопатологий: шизофрении, синдрома дефицита внимания и гиперактивности, биполярного аффективного расстройства и др. Также показана его вовлеченность в развитие ряда черт личности, в том числе экстраверсии и поиска новизны [5,9]. Полиморфный локус *rs1800955*, изученный в данной работе, также демонстрировал ассоциацию с тревожностью и импульсивностью [9]. Повышение средних

показателей по шкале оценивания результатов у носителей аллеля *rs1800955*C* удмуртской этнической принадлежности свидетельствует о развитости и адекватности самооценки, сформированности и устойчивости субъективных критериев оценки результатов у индивидов [1], что также укладывается в представления о вовлеченности локуса в формирование эмоциональных и поведенческих черт [5,9].

При анализе вариаций показателей гибкости была выявлена ассоциация аллеля *rs13212041*C* гена рецептора серотонина *HTR1B* с пониженными показателями по шкале гибкости в общей выборке (β = -0.28; P = 0.03; P_{FDR} = 0.20), однако данная тенденция не достигла уровня статистической значимости после FDR-коррекции (P_{FDR} > 0.05) (табл. 4).

Табл. 4. Результаты анализа ассоциаций полиморфных локусов генов моноаминергических систем с вариациями показателей по шкале гибкости.

Полиморф-ный локус (минорный / мажорный аллель)	Показатель	Общая выборка (N = 692)	Женщины (N = 558)	Мужчины (N = 134)	Русские (N = 207)	Татары (N = 223)	Удмурты (N = 128)
5-HTTLPR (L/S)	β	-0.04	-0.08	-0.20	0.11	0.02	0.13
	P	0.67	0.44	0.43	0.57	0.92	0.59
	P_{FDR}	0.88	0.70	0.80	0.57	0.92	0.59
rs1042173 (G/T)	β	-0.08	-0.08	-0.06	-0.18	-0.22	0.27
	P	0.43	0.46	0.80	0.37	0.19	0.28
	P_{FDR}	0.88	0.70	0.80	0.57	0.64	0.43
rs7322347 (A/T)	β	-0.08	-0.09	-0.07	-0.28	-0.19	-0.44
	P	0.45	0.47	0.80	0.18	0.35	0.07
	P_{FDR}	0.88	0.70	0.80	0.57	0.64	0.21
rs13212041 (C/T)	β	-0.28	-0.28	-0.32	-0.20	-0.28	-0.28
	P	**0.03**	0.07	0.27	0.42	0.23	0.26
	P_{FDR}	0.20	0.41	0.80	0.57	0.64	0.43
rs1800955 (C/T)	β	0.01	0.06	-0.19	-0.13	0.13	-0.22
	P	0.89	0.58	0.42	0.52	0.43	0.35
	P_{FDR}	0.89	0.70	0.80	0.57	0.64	0.43

Примечание. β – коэффициент регрессии; P – P-value; P_{FDR} – P-value после FDR-коррекции. Статистически значимые различия (до или после FDR-коррекции) выделены полужирным шрифтом.

Полиморфный локус *rs13212041*, расположенный в потенциальном сайте связывания мРНК *HTR1B* с *miR-96,* является функциональным, и при наличии минорного аллеля наблюдается снижение экспрессии гена и эффективности серотониновой рецепции, что может проявиться в развитии когнитивных и поведенческих нарушений [10]. Носители аллеля *rs13212041*C* в данном исследовании демонстрировали снижение средних показателей по шкале гибкости, проявляющихся в ухудшении адаптации к динамично изменяющимся условиям жизни [1]. Это свидетельствует в пользу того, что снижение экспрессии гена *HTR1B* может приводить не только к развитию агрессивного поведения [10], но и к ухудшению саморегуляции поведения и его компонентов.

Вторым этапом обработки результатов являлась оценка эффекта ген-средовых взаимодействий, учитывающая, наряду с генетическими вариантами, вовлеченность различных социально-демографических параметров в формирование каждого компонента саморегуляции (общий уровень саморегуляции, планирование, моделирование, программирование, оценка результатов, а также гибкость и самостоятельность). При анализе общего уровня саморегуляции было показано, что такие факторы, как «место рождения (деревня)» (β = -0.79; P = 0.04; P_{FDR} = 0.16) и «состав семьи (неполная семья)» (β = -1.71; P = 0.02; P_{FDR} = 0.16) модулируют ассоциацию полиморфного локуса *rs1800955* с пониженным уровнем саморегуляции; «порядок рождения (первый ребенок)» – ассоциацию локуса *5-HTTLPR* с повышенным уровнем саморегуляции (β = 0.86; P = 0.03; P_{FDR} = 0.18), тогда как «табакокурение» – ассоциацию локуса *5-HTTLPR* с пониженным уровнем саморегуляции (β = -1.64; P = 0.03; P_{FDR} = 0.19).

При анализе показателей планирования было выявлено, что «жестокое обращение в детстве» модулирует ассоциацию полиморфного локуса *rs13212041* с повышенными показателями по шкале планирования (β = 1.13; P = 0.007; P_{FDR} = 0.04); «порядок рождения (первый ребенок)» (β = -0.28; P = 0.04; P_{FDR} = 0.25) и «табакокурение» (β = -0.81; P = 0.002; P_{FDR} = 0.01) – ассоциацию локуса *5-HTTLPR* с пониженными показателями по шкале планирования, тогда как «место рождения (город)» – ассоциацию локуса *5-HTTLPR* с повышенными показателями по шкале планирования (β = 0.57; P = 0.001; P_{FDR} = 0.007).

Анализ показателей моделирования выявил, что такие социально-демографические факторы, как «место рождения (деревня)» (β = -0.29; P = 0.02; P_{FDR} = 0.14) и «состав семьи (неполная семья)» (β = -0.73; P = 0.001; P_{FDR} = 0.01) модулируют ассоциацию полиморфного локуса *rs1800955* с пониженными показателями по шкале моделирования.

При анализе показателей программирования было показано, что «место рождения (деревня)» модулирует ассоциацию полиморфного локуса *rs1800955* с пониженными показателями по шкале

программирования (β = -0.25; P = 0.03; P_{FDR} = 0.17), тогда как «порядок рождения (первый ребенок)» – ассоциацию локуса *5-HTTLPR* с пониженными показателями по шкале программирования (β = -0.24; P = 0.04; P_{FDR} = 0.23).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об основном эффекте полиморфных локусов *5-HTTLPR* гена *SLC6A4*, *rs1800955* гена *DRD4* и *rs13212041* гена *HTR1B* на формирование стилевых особенностей саморегуляции поведения (в частности, особенностей планирования, программирования, оценивания результатов и гибкости) у психически здоровых индивидов, однако лишь эффект полиморфного локуса *rs1800955* на вариации показателей по шкале оценивания результатов достиг уровня статистической значимости после FDR-коррекции ($P_{FDR} < 0.05$). Кроме того, вариация таких социально-демографических параметров, как «место рождения (город/деревня)», «состав семьи (неполная семья)», «порядок рождения (первый ребенок)», «жестокое обращение в детстве» и «табакокурение» у респондентов оказывали позитивный модулирующий эффект на ассоциацию полиморфных локусов *5-HTTLPR* гена *SLC6A4*, *rs1800955* гена *DRD4* и *rs13212041* гена *HTR1B* со стилевыми особенностями саморегуляции поведения. Дальнейшие исследования в данном направлении необходимо проводить с учетом взаимодействия генов-кандидатов различных систем, а также на выборках большего масштаба, что позволит преодолеть существующие в данной работе ограничения (средний размер имеющейся выборки и отсутствие независимой) и расширить представления о молекулярно-генетической природе саморегуляции поведения.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 122041400169-2) при частичной поддержке мегагрантов Правительства Российской Федерации (№ 075-15-2021-595) и Правительства Республики Башкортостан (Договор № 1 от 28.12.2021). Работа частично выполнена на оборудовании ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК». Образцы ДНК взяты из ЦКП «Коллекция биологических материалов человека» ИБГ УФИЦ РАН, поддержанного Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (№ 007-030164/2).

Исследование одобрено биоэтическим комитетом Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Колесников Е. П. Некоторые аспекты стилевой саморегуляции поведения у студентов // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Социология. Педагогика. Психология. 2016. Т. 2 (68). № 3. С. 69–77.
2. Дубровина О. В., Быстрова Н. В. Особенности стиля саморегуляции поведения студентов, склонных к зависимому поведению // Интернет-журнал «Мир науки». 2018. № 2. URL: https://mir-nauki.com/PDF/52PSMN218.pdf
3. Моросанова В. И. Стилевые особенности саморегуляции личности // Вопросы психологии. 1991. № 1. С. 121–127.
4. Karlsson L. R., Mallard T. T., Barr P. B. et al. Multivariate analysis of 1.5 million people identifies genetic associations with traits related to self-regulation and addiction // Nature Neuroscience. 2021. V. 24. № 10. P. 1367–1376.
5. Давыдова Ю. Д. Генетические и эпигенетические факторы развития агрессивного и депрессивного поведения человека: дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2022. 286 с.
6. Plomin R., Kovas Y., Haworth C. M. A. Generalist genes: genetic links between brain, mind, and education // Mind, brain and education: The official journal of the International Mind, Brain, and Education Society. 2007. V. 1. № 1. P. 11–19.
7. Gorodetsky E., Carli V., Sarchiapone M. et al. Predictors for self-directed aggression in italian prisoners include externalizing behaviors, childhood trauma and the serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR // Genes, Brain and Behavior. 2016. V. 15. № 5. P. 465–473.
8. Qadeer M. I., Amar A., Huang Y. Y. et al. Association of serotonin system-related genes with homicidal behavior and criminal aggression in a prison population of Pakistani Origin // Scientific Reports. 2021. V. 11. № 1. P. 1670.
9. Balestri M., Calati R., Serretti A., De Ronchi D. Genetic modulation of personality traits: a systematic review of the literature // International Clinical Psychopharmacology. 2014. V. 29. № 1. P. 1–15.
10. Jensen K. P., Covault J., Conner T. S. et al. A common polymorphism in serotonin receptor 1B mRNA moderates regulation by miR-96 and associates with aggressive human behaviors // Molecular Psychiatry. 2009. V. 14. № 4. P. 381–389.

© Давыдова Ю.Д., Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Мустафин Р.Н., Лобаскова М.М., Тахирова З.Р., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К., 2022

УДК: 577.2; 616-092.9
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.9

УРОВНИ ИНСУЛИНА И ЛЕПТИНА В КРОВИ И ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, ЛЕЧЕНЫХ МЕТФОРМИНОМ, ИНТРАНАЗАЛЬНЫМ ИНСУЛИНОМ И ИНГИБИТОРОМ ФОСФАТАЗЫ 1В

© Деркач К. В. [1*], Бондарева В. М. [1], Сорокоумов В.Н. [2], Шпаков А.О. [1,2]
[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), г. Санкт-Петербург;
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург
*derkatch_k@list.ru

Аннотация. В условиях метаболического синдрома (МС) и сахарного диабета 2-го типа отмечаются значительные нарушения инсулиновых и лептиновых сигнальных путей не только на периферии, но и в мозге, где эти пути играют важную роль в центральной регуляции метаболизма, функций эндокринной и других систем. Одной из причин ослабления инсулинового и лептинового сигналинга в ЦНС является ослабление транспорта инсулина и лептина через гематоэнцефалический барьер, что обусловлено резистентностью клеток, образующих этот барьер, к инсулину и лептину. Улучшение такого транспорта может стать одним из подходов для нормализации инсулинового и лептинового сигналинга в мозге при метаболических расстройствах. Цель работы состояла в исследовании влияния обработки самцов крыс с МС, вызванным четырехмесячной комбинированной высокоуглеводной и высокожировой диетой, с помощью метформина (4 недели, 200 мг/кг/сутки, перорально), интраназально вводимого инсулина (ИВИ) (4 недели, 0.5 МЕ/крысу/сутки) и ингибитора протеинфосфотирозинфосфатазы 1В (PTP1B) (2 недели, 10 мг/кг/сутки, в/б) на массу тела, метаболические и гормональные показатели и гипоталамические уровни инсулина и лептина. Метформиновая терапия нормализовала массу тела и жировой ткани, уровни глюкозы и толерантность к глюкозе у МС-крыс, снижала повышенные у них базовый и стимулированный глюкозой уровни инсулина и лептина в крови, восстанавливая при этом уровни

инсулина и лептина в гипоталамусе. Это приводило к нормализации соотношений гормонов в крови и гипоталамусе, значительно повышенном при МС, что указывает на улучшение их транспорта в мозг. Уровни лептина и инсулина в гипоталамусе восстанавливались также при обработке ингибитором PTP1B, в то время как ИВИ в этом отношении был менее эффективен. В то же время оба, ингибитор PTP1B и ИВИ, уступали метформину по способности восстанавливать метаболические и гормональные показатели. Таким образом, нами впервые показано восстанавливающее действие терапии метформином, ИВИ и ингибитором PTP1B на уровни инсулина и лептина в гипоталамусе МС-крыс, продемонстрированы различия в эффективности и селективности такого действия, а также проведено сопоставление восстанавливающего потенциала изученных препаратов на метаболические и гормональные показатели с их способностью улучшать транспорт инсулина и лептина через гематоэнцефалический барьер.

Ключевые слова: метаболический синдром, гипоталамус, лептин, интраназально вводимый инсулин, метформин, протеинфосфотирозинфосфатаза 1B

THE BLOOD AND HYPOTHALAMIC INSULIN AND LEPTIN LEVELS IN RATS WITH DIET-INDUCED METABOLIC SYNDROME TREATED WITH METFORMIN, INTRANASAL INSULIN AND PHOSPHATASE 1B INHIBITOR

Derkach K.V. [1*], Bondareva V.M. [1], Sorokoumov V.N. [2], Shpakov A.O. [1,2]

[1]Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia;

[2] Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

*derkatch_k@list.ru

Abstract. Under the conditions of metabolic syndrome (MS) and type 2 diabetes mellitus, significant impairments of insulin and leptin signaling pathways are observed not only at the periphery, but also in the brain, where these pathways play an important role in the central regulation of metabolism, the functions of the endocrine and other systems. One of the reasons for the weakening of insulin and leptin signaling in the CNS is the weakening of the transport of insulin and leptin through the blood-brain barrier, which is due to the resistance of the cells that form this barrier to

insulin and leptin. Improving such transport may be one of the approaches to normalize insulin and leptin signaling in the brain in metabolic disorders. The aim of this work was to investigate the effect of treatment of male rats with MS induced by a four-month combined high-carbohydrate and high-fat diet with metformin (4 weeks, 200 mg/kg/day, orally), intranasally administered insulin (IAI) (4 weeks, 0.5 IU/rat/day) and protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitor (9 days, 20 mg/kg/day, i.p.) on body weight, metabolic and hormonal parameters, and hypothalamic levels of insulin and leptin. Metformin therapy normalized body and adipose tissue weight, glucose levels, and glucose tolerance in MS rats, and reduced their elevated basal and glucose-stimulated blood levels of insulin and leptin, while restoring insulin and leptin levels in the hypothalamus. This led to the normalization of hormone ratios in the blood and hypothalamus, which was significantly increased in MS, indicating an improvement in their transport to the brain. The intrahypothalamic levels of leptin and insulin were restored by the treatment with PTP1B inhibitor, while IAI was less effective in this respect. At the same time, both the PTP1B inhibitor and IAI were less effective in restoring the metabolic and hormonal parameters as compared to metformin. Thus, we have shown for the first time the restorative effect of therapy with metformin, IAI, and a PTP1B inhibitor on the levels of insulin and leptin in the hypothalamus of MS rats. Along with this, differences in the effectiveness and selectivity of this action were demonstrated, and the restoring potential of the studied drugs on metabolic and hormonal parameters was compared with their ability to improve the transport of insulin and leptin through the blood-brain barrier.

Keywords: metabolic syndrome, hypothalamus, leptin, intranasally administered insulin, metformin, protein phosphotyrosine phosphatase 1B

Введение

Важное место среди факторов, приводящих к развитию абдоминального ожирения, сахарного диабета 2-го типа и метаболического синдрома (МС), отводят ослаблению активности инсулиновых и лептиновых сигнальных путей в гипоталамусе. Эти пути ответственны за центральную регуляцию пищевого поведения, периферического метаболизма, функций эндокринной системы, а также во многом определяют чувствительность периферических тканей к инсулину и лептину [**1,2**]. Тем самым, инсулиновый и лептиновый сигналинг на периферии в определенной степени зависит от активности тех же сигнальных путей в мозге [**3**]. Ослабление

активности инсулиновых и лептиновых путей в гипоталамусе и других отделах мозга может быть обусловлено рядом причин. Важнейшая из них состоит в снижении уровня инсулина и лептина в ЦНС в условиях инсулиновой и лептиновой резистентности, как показано нами при изучении различных метаболических расстройств [**4,5**]. Несмотря на повышенный уровень инсулина и лептина в крови, рецептор-опосредуемый транспорт обоих гормонов через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) нарушен, что обусловлено снижением эффективности связывания рецепторов с инсулином и лептином. Так нами при изучении агути-мышей с сильно выраженной гиперлептинемией и гиперинсулинемией показан значительный дефицит лептина и инсулина в гипоталамусе [**5**]. Необходимо принимать во внимание изменение скорости деградации инсулина и лептина вследствие активации ряда специфичных протеаз. Другая, не менее важная причина ослабления инсулинового и лептинового сигнальных путей в ЦНС состоит в снижении активности их компонентов, что может быть следствием компенсаторного повышения активности тирозиновых фосфатаз. В первую очередь, это относится к протеинфосфотирозинфосфатазе 1B (PTP1B), которая дефосфорилирует рецепторы инсулина и лептина, белки-субстраты инсулинового рецептора (IRS1, IRS2) и нерецепторную тирозинкиназу JAK2, являющиеся компонентами инсулинового и лептинового сигналинга [**6,7**]. Соответственно, в условиях метаболических расстройств ингибиторы тирозиновых фосфатаз способны усилить инсулиновые и сигнальные пути и на периферии, и в структурах мозга, восстанавливая, тем самым, центральную регуляцию метаболических и физиологических процессов [**6,8**]. В клинике для коррекции ожирения, диабета 2-го типа и МС широко применяют метформин [**9**]. Значительные перспективы при лечении этих метаболических расстройств также связывают с применением интраназально вводимого инсулина (ИВИ) [**3,10**]. Однако сравнительный анализ эффективности различных фармакологических подходов на экспериментальной модели МС не проводился и не было изучено влияние ингибиторов PTP1B, метформина и ИВИ на уровни инсулина и лептина в ЦНС, что важно для оценки транспорта гормонов через ГЭБ и возможного вклада этого процесса в восстановление инсулинового и лептинового сигналинга в мозге. Цель работы состояла в исследовании влияния обработки крыс с МС, вызванным комбинированной высокоуглеводной и высокожировой диетой, с помощью метформина, ИВИ и ранее разработанного нами ингибитора PTP1B на массу тела,

метаболические и гормональные показатели, а также на гипоталамические уровни инсулина и лептина.

Материалы и методы

В экспериментах использовали самцов крыс Wistar, которых содержали в стандартных условиях вивария. Модель МС у самцов крыс Wistar вызывали их переводом, начиная с дня Р26, на комбинированную высокоуглеводную и высокожировую диету, включающую 30 % раствор сахарозы (вместо питьевой воды) и насыщенные жиры (5 г маргарина/крысу/сутки) в дополнение к сухому корму. Эту диету животные получали в течение четырех месяцев до начала обработки препаратами (в случае ингибитора PTP1B – в течение 4.5 месяцев). Контрольные крысы потребляли обычную воду и сухой корм. В возрасте 3.5 месяцев крыс тестировали и отбирали животных с явными признаками МС. Критериями отбора были повышение массы тела не менее чем на 10% и повышение уровня постпрандиальной глюкозы не менее чем на 25% в сравнении со средними значениями у контрольной группы, а также нарушенная толерантность к глюкозе, которую оценивали в глюкозотолерантном тесте (ГТТ). Для этого крысам в/б вводили глюкозу (2 г/кг) и измеряли ее уровень в крови в течение 120 мин. Кровь забирали из хвостовой вены под местным наркозом (анестезию проводили лидокаином в дозе 2-4 мг/кг). МС-крыс случайным образом распределяли на группы (в каждой по 6 животных) – без лечения («МС»), с лечением метформином (4 недели, 200 мг/кг/сутки, перорально, «МСМ»), инсулином (4 недели 0.5 МЕ/крысу, интраназально, «МСИ») и ингибитором фосфатазы PTP1B – этил 3-(гидроксиметил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилатом (2 недели, 10 мг/кг/сутки, в/б, «МСФ»). Синтез и изучение биологической активности используемого ингибитора PTP1B были описаны нами ранее [**11**]. За 3 дня до окончания эксперимента повторно проводили ГТТ и оценивали базальный и стимулированный глюкозной нагрузкой уровни инсулина и лептина. В конце эксперимента животных наркотизировали хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б), декапитировали и забирали образцы крови и ткани гипоталамуса для определения гормонов.

Уровни инсулина и лептина в крови и образцах ткани гипоталамуса измеряли с помощью ИФА-наборов «Rat Insulin ELISA» («Mercodia», Швеция) и «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США), как описано ранее [**5**]. Уровни глюкозы в крови, в том числе

при проведении ГТТ, оценивали с помощью тест-полосок «One Touch Select» (США) и глюкометра («Life Scan Johnson & Johnson», Дания).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007», результаты представляли, как *M*±*SEM*. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при уровне значимости $p<0.05$.

Результаты и обсуждение

У крыс с МС отмечали повышение массы тела и жировой ткани, отчетливо выраженную гиперинсулинемию и гиперлептинемию, гипергликемию, повышенный индекс инсулиновой резистентности (ИР), оцениваемый как произведение уровней инсулина и глюкозы натощак, а также нарушенную толерантность к глюкозе, оцениваемую по значению AUC[0-120], представляющему интегрированную площадь под глюкозной кривой в ГТТ (табл. 1). В гипоталамусе крыс группы «МС» отмечали значительное снижение уровня лептина и тенденцию к снижению уровня инсулина, а также значительное повышение в сравнении с контролем соотношений концентрации гормонов в крови и гипоталамусе, которое в случае лептина было повышено в 7.2 раз, в случае инсулина – в 3.3 раза (табл. 2).

Лечение метформином в наибольшей степени в сравнении с другими подходами восстанавливало метаболические и гормональные показатели. В группе «МСМ» значимо снижались масса тела и абдоминального жира, базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина, а также, как продемонстрировал ГТТ, восстанавливалась чувствительность к глюкозе (**табл. 1**). Наряду с этим, метформин полностью нормализовал уровни инсулина и лептина в гипоталамусе и соотношение гормонов в плазме и гипоталамусе (**табл. 2**). Это указывает на вызываемое метформиновой терапией улучшение транспорта инсулина и лептина через ГЭБ. Имеются основания полагать, что улучшение такого транспорта обусловлено повышением чувствительности к инсулину и лептину перицитов, астроцитов и нейронов, образующих нейроваскулярные единицы, являющиеся анатомическими элементами ГЭБ, а, следовательно, интенсификацией рецептор-опосредуемого эндоцитоза в этих клетках, как механизма поступления инсулина и лептина в структуры мозга.

Таблица 1. Масса тела и жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и лептина до и через 120 мин после глюкозной нагрузки, значения AUC[0-120] для глюкозной концентрационной кривой в ГТТ, индекс ИР у крыс с МС, а также влияние на эти показатели обработки метформином, интраназальным инсулином и PTP1B-ингибитором

Параметр	Контроль	«МС»	«МСМ»	«МСИ»	«МСФ»
Масса тела, г	373±10	427±9*	382±10#	405±11	367±13#
Масса жира, г	9.1±0.4	17.9±1.5*	11.2±0.8#	15.2±0.9*	9.2±0.5#
Глюкоза-0, мМ	4.4±0.2	5.6±0.3	4.6±0.3	5.0±0.3	4.8±0.3
Глюкоза-120, мМ	5.2±0.2	7.5±0.4*	5.4±0.4#	5.9±0.3	5.7±0.4#
AUC[0-120], усл. ед.	1160±33	1525±61*	1174±66#	1383±40*	1321±60
Инсулин-0, нг/мл	0.49±0.08	1.03±0.10*	0.47±0.05#	0.42±0.06#	0.65±0.13
Инсулин-120, нг/мл	0.58±0.06	1.58±0.15*	0.70±0.09#	0.66±0.09#	0.82±0.12#
Индекс ИР, усл. ед.	2.11±0.29	5.85±0.73*	2.12±0.21#	2.05±0.22#	3.02±0.51#
Лептин-0, нг/мл	0.87±0.14	3.73±0.40*	1.67±0.24#	2.97±0.23*	1.09±0.20#
Лептин-120, нг/мл	1.11±0.16	6.20±0.72*	2.11±0.31#	4.43±0.48*	1.41±0.30#

Примечание. * - различия с контрольными крысами статистически значимы при $p < 0.05$,
- различия с группой «МС» статистически значимы при $p < 0.05$. Масса жировой ткани включает массу абдоминального и эпидидимального жира. Цифрами 0 и 120 – обозначено время забора крови в ГТТ: перед глюкозной нагрузкой (0) и через 120 мин после нее (120). Данные представлены, как $M \pm SEM$, во всех группах n=6.

Эффекты ИВИ были выражены намного слабее. В группе «МСИ» отмечали значимое снижение в сравнении с группой «МС» уровня инсулина и индекса ИР, а также нормализацию соотношения уровней инсулина в крови и гипоталамусе (табл. 1, 2). Ингибитор PTP1B, в значительной степени подавляя аппетит и потребление корма, с высокой эффективностью снижал массу тела и жировой ткани, а также понижал постпрандиальный уровень глюкозы, базовый уровень лептина, глюкоза-стимулированные уровни инсулина и лептина (табл. 1). Он также частично восстанавливал

гипоталамический уровень лептина, причем соотношение лептина в крови и гипоталамусе в группе «МСФ» было сходным с таковым в контроле и значимо отличалось от этого соотношения в группе «МС» (табл. 2). Наряду с этим в группе «МСФ» в значительной степени нормализовалось соотношение для уровней инсулина и лептина в крови и гипоталамусе (табл. 2).

Таблица 2. Уровни инсулина и лептина в крови и гипоталамусе МС-крыс, их соотношение и влияние на эти показатели обработки метформином, интраназальным инсулином и PTP1B-ингибитором

Параметр	Контроль	«МС»	«МСМ»	«МСИ»	«МСФ»
Инсулин, нг/мл (кровь)	0.58±0.08	1.18±0.15*	0.62±0.11#	0.51±0.07#	0.59±0.11#
Инсулин, нг/г (гипоталамус)	1.30±0.17	0.88±0.07	1.15±0.12	0.76±0.10	1.01±0.06
Инсулин, кровь/ гипоталамус	0.44±0.02	1.37±0.19*	0.52±0.06#	0.70±0.09#	0.56±0.08#
Лептин, нг/мл (кровь)	0.85±0.14	3.45±0.38*	1.64±0.29#	2.38±0.28*	0.94±0.19#
Лептин, нг/г (гипоталамус)	5.16±0.48	3.38±0.21*	4.21±0.29	3.70±0.31	3.10±0.41*
Лептин, кровь/ гипоталамус	0.16±0.02	1.03±0.12*	0.39±0.08#	0.67±0.12*	0.31±0.05#

Примечание. * - различия с контрольными крысами статистически значимы при $p < 0.05$, # - различия с группой «МС» статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены, как $M \pm SEM$, во всех группах n=6.

Обнаруженные эффекты ингибитора PTP1B обусловлены повышением чувствительности тканей к лептину и, в меньшей степени, к инсулину, как результат подавления активности фосфатазы PTP1B, негативного регулятора лептинового и инсулинового сигналинга. Как известно, эта фосфатаза дефосфорилирует активированные гормонами фосфоформы рецепторов инсулина и лептина и IRS1/2-белков, а также дефосфорилирует нерецепторную тирозинкиназу JAK2, которая ассоциирована с лептиновым рецептором и опосредует активацию 3-фосфоинозитидного пути, важнейшего внутриклеточного каскада как в случае инсулинового, так и лептинового сигналинга [6,7]. Тот факт, что эффект ингибитора PTP1B был более выражен в отношении транспорта лептина, возможно, обусловлен большим вкладом этой фосфатазы именно в лептиновые сигнальные пути [12]. Кроме того,

нами показано, что ингибитор PTP1B существенно в меньшей степени снижает индекс ИР, повышенный в группе «МС» (табл. 1).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что при коррекции метаболических и гормональных показателей у крыс с диета-индуцированным МС, среди изученных фармакологических препаратов наиболее эффективным был метформин, в то время как ингибитор PTP1B и ИВИ ему в этом уступали. Восстанавливающие эффекты препаратов были ассоциированы с их способностью улучшать транспорт инсулина и лептина через ГЭБ, поскольку метформин и ингибитор PTP1B нормализовали такой транспорт для обоих гормонов, в то время как ИВИ только для инсулина. Полученные нами данные впервые демонстрируют восстанавливающие эффекты терапии крыс с МС с помощью метформина, ИВИ и ингибитора PTP1B на транспорт инсулина и лептина через ГЭБ и позволяют сопоставить выраженность этих эффектов с метаболическими и гормональными эффектами такой терапии.

Финансирование. Средства государственного бюджета Минобрнауки России по государственному заданию № 075-0152-22-00, с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

Все эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals»

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Kleinridders A., Ferris H. A., Cai W., Kahn C. R. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function // Diabetes. 2014. Vol. 63. No. 7. P. 2232-2243.
2. Agrawal R., Reno C. M., Sharma S., Christensen C., Huang Y., Fisher S. J. Insulin action in the brain regulates both central and peripheral functions // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2021. Vol. 321. No 1. P. E156-E163.
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 (FSO). 2015. Vol. 1. No 3. FSO25.
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. P. 821-837.
5. 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.
6. Bakke J., Haj F.G. Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation // Semin. Cell Dev. Biol. 2015. Vol. 37. P. 58-65.
7. Sorokoumov V.N., Shpakov A.O. Protein phosphotyrosine phosphatase 1B: Structure, function, role in the development of metabolic disorders and their correction by the enzyme inhibitors // J. Evol. Biochem. Physiol. 2017. Vol. 53. No 4. P. 259–270.
8. Singh S., Singh Grewal A., Grover R., Sharma N., Chopra B., Kumar Dhingra A., Arora S., Redhu S., Lather V. Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders // Bioorg. Chem. 2022. Vol. 121. P. 105626.
9. Grammatiki M., Sagar R., Ajjan R. A. Metformin: Is it Still the First Line in Type 2 Diabetes Management Algorithm? // Curr. Pharm. Des. 2021. Vol. 27. No 8. P. 1061-1067.
10. Hallschmid M. Intranasal insulin // J. Neuroendocrinol. 2021. Vol. 33. No 4. P. e12934.
11. Zakharova I. O., Sorokoumov V. N., Bayunova L. V., Derkach K. V., Shpakov A. O. 4-Oxo-1,4-dihydrocinnoline derivative with phosphatase 1B inhibitor activity enhances leptin signal transduction in hypothalamic neurons // J. Evol. Biochem. Physiol. 2018. Vol. 54. No 4. P. 273–280.
12. Flores-Cordero J. A., Pérez-Pérez A., Jiménez-Cortegana C., Alba G., Flores-Barragán A., Sánchez-Margalet V. Obesity as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease: The Role of Leptin // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. No 9. P. 5202.

© Деркач К.В., Бондарева В.М.,
Сорокоумов В.Н., Шпаков А.О., 2022

УДК: 577.2; 616-092.9
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.10

ВЛИЯНИЕ ЛЕЧЕНИЯ САМЦОВ КРЫС С «НЕОНАТАЛЬНОЙ» МОДЕЛЬЮ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА С ПОМОЩЬЮ МЕТФОРМИНА И ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ИНСУЛИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФУНКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© Деркач К. В. [1*], Иванцов А.О. [2], Бондарева В.М. [1], Шпаков А.О. [1,3]
[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), г. Санкт-Петербург;
[2]Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный;
[3]Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург
*derkatch_k@list.ru

Аннотация. Временное прекращение грудного вскармливания может приводить к развитию сходных с метаболическим синдромом расстройств во взрослом возрасте. Однако функциональные нарушения и состояние инсулин-продуцирующих панкреатических островков при таких расстройствах мало изучены, а фармакологические подходы для предотвращения запрограммированного в раннем постнатальном периоде метаболического синдрома не разработаны. Целью работы было исследовать влияние терапии метформином и интраназально вводимым инсулином на метаболические показатели, уровни гормонов и число панкреатических островков у взрослых самцов крыс Wistar, которые в раннем онтогенезе (P19–P21) были лишены грудного вскармливания. Показано, что в отсутствие лечения у 10-тимесячных самцов крыс были повышены масса тела и жировой ткани, уровни триглицеридов, общего холестерина, базального и стимулированного глюкозой лептина, нарушена толерантность к глюкозе, а также на 48% уменьшена площадь панкреатических островков в поджелудочной железе. Четырехнедельное лечение метформином (перорально 120 мг/кг/сутки), но не инсулином (интраназально, 0.5 МЕ/крысу/сутки), в значительной степени восстанавливало эти показатели, включая площадь панкреатических островков, причем совместное применение препаратов в тех же дозах усиливало восстанавливающие эффекты метформина. Полученные нами данные указывают на перспективы

применения метформина и его комбинации с интраназально вводимым инсулином для восстановления развивающихся во взрослом возрасте метаболических и гормональных нарушений, обусловленных дефицитом питания в раннем онтогенезе.

Ключевые слова: *метаболический синдром, интраназально вводимый инсулин, метформин, гиперлептинемия, панкреатические островки*

EFFECT OF TREATMENT OF MALE RATS WITH NEONATAL METABOLIC SYNDROME MODEL WITH METFORMIN AND INTRANASAL INSULIN ON METABOLIC PARAMETERS AND PANCREATIC FUNCTION

Derkach K.V. [1*], Ivantsov A.O. [2], Bondareva V.M. [1], Shpakov A.O. [1,3]
[1]Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia;
[2] N.N. Petrov Institute of Oncology, Pesochniy, Saint-Petersburg, Russia;

[3]Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia
*derkatch_k@list.ru

Abstract. Temporary cessation of breastfeeding can lead to the development of metabolic syndrome-like disorders in adulthood. However, functional disorders and the state of insulin-producing pancreatic islets in such disorders have been little studied, and pharmacological approaches to prevent the metabolic syndrome programmed in the early postnatal period have not been developed. The aim of the study was to investigate the effect of metformin and intranasal insulin therapy on metabolic parameters, hormone levels and the number of pancreatic islets in adult male Wistar rats that were deprived of breastfeeding in early ontogenesis (P19–P21). It was shown that in the absence of treatment in 10-month-old male rats, body weight and adipose tissue, levels of triglycerides, total cholesterol, basal and glucose-stimulated leptin were increased, glucose tolerance was impaired, and the area of pancreatic islets in the pancreas was reduced by 48%. Four weeks of treatment with metformin (oral 120 mg/kg/day), but not insulin (intranasal, 0.5 IU/rat/day), significantly restored these parameters, including the area of pancreatic islets, and the combined use of drugs at the same doses enhanced the restorative effects of metformin. Our data indicate the prospects for the use of metformin and its combination with intranasally administered insulin for the restoration of metabolic and hormonal

disorders that develop in adulthood due to nutritional deficiencies in early ontogenesis.

***Keywords**: metabolic syndrome, intranasally administered insulin, metformin, hyperleptinemia, pancreatic islets*

Введение

Одной из причин метаболических нарушений, развивающихся в пубертатном и более позднем возрасте, является нарушение грудного вскармливания, как вследствие недостатка потребления материнского молока, так и в результате его замены искусственными молочными смесями [1,2]. Это обусловлено тем, что в составе материнского молока в организм новорожденного поступает не только много полезных веществ, но и ряд материнских гормонов и ростовых факторов, воздействующих на нервную, эндокринную, сердечно-сосудистую и другие системы, которые жизненно необходимы для нормального развития организма [3]. Развивающиеся в результате этого в зрелом возрасте метаболические и функциональные нарушения сходны с метаболическим синдромом (МС), поскольку для пациентов с нарушением грудного вскармливания характерны повышение массы тела (абдоминальное ожирение), нарушенная толерантность к глюкозе, сниженная чувствительность к лептину, дислипидемия, дисфункции сердечно-сосудистой системы [1,2]. При этом эффективных подходов, направленных на восстановление этих нарушений, в настоящее время почти нет, вследствие чего одной из острых проблем современной эндокринологии является их разработка. В качестве одного из таких подходов может быть использована терапия метформином, широко используемым для лечения сахарного диабета 2-го типа, а также использование интраназально вводимого инсулина (ИВИ), который непосредственно воздействует на структуры ЦНС [4-6]. Целью исследования было изучить влияние терапии метформином и ИВИ, в том числе при совместном использовании, на метаболические показатели, уровни инсулина, лептина и число панкреатических островков у взрослых крыс, которые в раннем онтогенезе (P19–P21) были лишены грудного вскармливания, вследствие чего у них развились некоторые черты МС.

Материалы и методы

В опытах использовали самцов крыс Wistar, которые получали стандартную диету (гранулированный сухой корм) и питьевую воду без ограничений. Для создания «ранней постнатальной» модели МС самцов крысят в течение трех дней (P19–P21) лишали грудного

вскармливания, для чего кормящим самкам начиная со второй половины дня P18 перорально давали бромокриптин («Gedeon Richter, Plc.», Венгрия) в суточной дозе 10 мг/крысу. С дня P22 крысят переводили на стандартный сухой корм. При достижении животными возраста 9 месяцев оценивали массу тела, а также чувствительность к глюкозе, для чего проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ), в ходе которого крысам внутрибрюшинно вводили глюкозу однократно, в дозе 2 г/кг, и затем с помощью тест-полосок «One Touch Select» (США) и глюкометра («Life Scan Johnson & Johnson», Дания) в течение 120 мин оценивали уровень глюкозы в крови животных, как описано ранее [7]. Самцов крыс с повышенной массой тела и нарушенной толерантностью к глюкозе рассматривали как группу МС. В дальнейшем случайным образом животных с МС делили на 4 группы (в каждой по 6 крыс) – без лечения («МС»), с 4-недельным лечением метформином, перорально, в суточной дозе 120 мг/кг («МСМ»), с 4-недельным лечением ИВИ в суточной дозе 0.25 МЕ/крысу («МСИ»), совместно метформином и ИВИ в те же сроки и в тех же дозах («МСМИ»). Контрольная группа вместо препаратов получала физиологический раствор («К»). За неделю до окончания эксперимента во всех группах повторно оценивали толерантность к глюкозе, а также измеряли уровни инсулина и лептина до нагрузки глюкозой и через 120 мин после нее, используя ИФА-наборы «Rat Insulin ELISA» («Mercodia», Швеция) и «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США), как описано ранее [8]. Кровь забирали из хвостовой вены под местным наркозом, для чего использовали анестезию лидокаином, который вводили в дозе 3 мг/кг.

В конце эксперимента в крови животных оценивали уровень свободных жирных кислот (набор «NEFA FS kit», «DiaSys», Германия), содержание гликированного гемоглобина (набор «Multi Test HbA1c System kit», «Polymer Technology Systems», США), концентрацию триглицеридов и общего холестерина (тест-полоски «Triglycerides multiCare-in» и «Cholesterol multiCare-in», «Biochemical Systems Int.», Италия). Затем животных наркотизировали хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б), декапитировали, измеряли массу абдоминального жира и оценивали морфологию островков поджелудочной железы.

Ткани поджелудочной железы фиксировали в 10%-ном формалине в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7.4) и использовали для гистологического анализа. Процедуру гистохимического окрашивания островков поджелудочной железы с помощью гематоксилина и эозина проводили с использованием прибора «Thermo Scientific Lab Vision Autostainer 720» («Thermo Fisher Scientific», США). Морфометрические

измерения оцифрованных изображений окрашенных красителями срезов поджелудочной железы осуществляли с помощью программного обеспечения «AxioVision» («Carl Zeiss», Германия), как описано ранее [9]. Оценивали число панкреатических островков и их диаметр (в микронах), а для количественной оценки общей площади островков использовали произведение этих показателей.

Статистический анализ осуществляли с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007», результаты представляли как среднее±стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при уровне значимости $p<0.05$.

Результаты и обсуждение

У необработанных 10-тимесячных самцов крыс с «ранней постнатальной» моделью МС, вызванной прерыванием грудного вскармливания в раннем онтогенезе (P19–P21), отмечали повышение массы тела и абдоминального жира, нарушение толерантности к глюкозе, гиперлептинемию, дислипидемию. О нарушении глюкозного гомеостаза и снижении толерантности к глюкозе, оцениваемой в ГТТ, свидетельствовало повышение уровня глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки, повышение значения $AUC_{[0-120]}$ (интегрированная площадь под глюкозной кривой в ГТТ), а также тенденция к повышению уровня глюкозы натощак и содержания гликированного гемоглобина (табл. 1). У МС-крыс также имелись явные признаки нарушения липидного обмена – в крови были повышены уровни триглицеридов и общего холестерина и имелась тенденция к увеличению содержания свободных жирных кислот (табл. 1).

Таблица 1. Масса тела и абдоминального жира, содержание липидов, гликированного гемоглобина, лептина и инсулина, а также значение $AUC_{[0-120]}$ для глюкозной кривой у взрослых самцов крыс с «ранней постнатальной» моделью МС, и влияние на них лечения метформином и ИВИ

Показатель	«К»	«МС»	«МСМ»	«МСИ»	«МСМИ»
Масса тела, г	401±10	467±14 [a]	428±16	456±13 [a]	412±10 [b]
Масса АЖ, г	6.9± 0.3	10.9± 0.8 [a]	7.2± 0.4 [b]	9.2± 0.4 [a]	7.0±0.4 [b]
ТГ, мМ	2.2± 0.2	3.3± 0.3 [a]	2.5± 0.4	2.9±0.2 [a]	2.5±0.2 [b]
ОХ, мМ	4.5±0.2	5.7±0.4 [a]	4.7±0.2 [b]	4.7±0.6	4.6±0.3 [b]
СЖК, мМ	3.9±0.2	4.8±0.5	4.3±0.3	4.1±0.2	4.2±0.4
HbA1c, %	4.5±0.3	5.4±0.4	4.6±0.3	4.5±0.2 [b]	4.3±0.2 [b]
Глюкоза (0), мМ	4.1±0.1	4.7±0.4	4.3±0.2	4.4±0.1	4.2±0.2
Глюкоза (120), мМ	4.5±0.2	5.7±0.4 [a]	4.7±0.4	4.8±0.4	4.2±0.2 [b]
$AUC_{[0-120]}$	1129±39	1518±41 [a]	1328±67	1419±45 [a]	1193±39 [b]
Инсулин (0), нг/мл	0.51±0.09	0.48±0.10	0.58±0.07	0.39± 0.11	0.53±0.05
Инсулин (120), нг/мл	0.70±0.09	1.42±0.15 [a]	0.82±0.08 [b]	0.88±0.10 [b]	0.80±0.12 [b]
Лептин (0), нг/мл	1.14±0.17	2.43±0.36 [a]	1.50±0.22 [b]	1.91±0.43	1.37±0.26 [b]
Лептин (120), нг/мл	1.50±0.19	3.28±0.40 [a]	1.99±0.25 [b]	2.36±0.54	1.74±0.37 [b]

Примечания. Принятые сокращения: АЖ – абдоминальный жир, ТГ – триглицериды, ОХ – общий холестерин, СЖК – свободные жирные кислоты, $AUC_{[0-120]}$ – площадь под кривой «концентрация глюкозы, мМ – время, мин» (в условных единицах) в глюкозотолерантном тесте. Представлены уровни инсулина и лептина до глюкозной нагрузки (0) и через 120 мин после нее. Различия с группами «К» ([a]) и «МС» ([b]) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, n=6 в каждой группе.

Другие авторы у 3–6-тимесячных крыс с ограничением грудного вскармливания, вызванным подавлением лактации у кормящих самок бромокриптином или метилглиоксалем, также отмечали ожирение, дислипидемию, постпрандиальную гипергликемию, нарушенную толерантность к глюкозе [10,11]. В группе «МС» отмечали повышение в крови базального и стимулированного глюкозой уровня лептина, ассоциированное с повышением массы жировой ткани, продуцирующей этот адипокин (табл. 1). Эти данные указывают на

снижение чувствительности тканей к лептину и хорошо согласуется с результатами других авторов о повышении уровня лептина у крыс с краткосрочным прекращением грудного вскармливания [10]. У МС-крыс базальный уровень инсулина в крови не отличался от такового в контрольной группе, а через 120 мин после нагрузки отмечали лишь тенденцию к повышению уровня инсулина, но различия с группой «К» не были статистически значимыми (табл. 1). Значение индекса инсулиновой резистентности, рассчитанное как произведение уровней инсулина и глюкозы, в группе «МС» значимо не отличалось от контроля (данные не представлены). Это достаточно необычно для классической патогенетической картины МС с гиперинсулинемией.

С целью оценить причину отсутствия гиперинсулинемии у МС-крыс, нами была изучена морфология панкреатических островков поджелудочной железы. В результате в группе «МС» было показано значимое снижение в сравнении с контролем числа островков и двукратное снижение произведения числа островков на их диаметр, позволяющее оценить общую площадь островков (табл. 2). Это свидетельствует о снижении числа продуцирующих инсулин β-клеток, что, возможно, и является основной причиной отсутствия гиперинсулинемии, характерной для инсулинорезистентных состояний (диета-индуцированный МС, диабет 2-го типа). До наших исследований ультраструктура поджелудочной железы у крыс с «ранней постнатальной» моделью МС не изучалась.

Таблица 2. Число и диаметр панкреатических островков в поджелудочной железе у взрослых самцов крыс с «ранней постнатальной» моделью МС, и влияние на них лечения метформином и ИВИ.

Группа	Число островков*	Диаметр островков, μm	Произведение числа островков на их диаметр, $x10^3$
«К»	45 ± 8	182 ± 43	8.19
«МС»	24 ± 4[a]	168 ± 35	4.03
«МСМ»	38 ± 10	194 ± 31	7.37
«МСИ»	33 ± 11	185 ± 27	6.11
«МСМИ»	39 ± 13	197 ± 33	7.68

Примечания. * - число островков рассчитано для одного из срезов с максимальной площадью каждой поджелудочной железы. Различия с группой «К» ([a]) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, n=6 в каждой группе.

Далее мы изучили различные варианты фармакологической коррекции выявленных метаболических и функциональных

расстройств, для чего использовали монотерапию ИВИ и метформином, а также их комбинацией. Было показано, что терапия метформином нормализовала массу тела и жировой ткани, показатели липидного обмена и улучшала чувствительность к глюкозе, что выражалось в нормализации уровня глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки и снижении значения $AUC_{[0-120]}$ (табл. 1). При этом снижались уровни лептина, что указывает на повышение чувствительности тканей к инсулину. Нами показано восстановление в группе «МСМ» числа и площади панкреатических островков (табл. 2). Имеются многочисленные данные о том, что метформиновая терапия нормализует массу тела, улучшает метаболические и гормональные показатели при ожирении, МС и диабете 2-го типа [5,6], включая и наши данные по лечению метформином животных с экспериментальными моделями этих заболеваний [7,8]. Однако информация о восстанавливающем эффекте метформина в отношении метаболических расстройств, вызванных нарушением грудного вскармливания, до настоящего времени отсутствовала. Также нет данных о терапевтическом эффекте ИВИ. Нами, однако, не было обнаружено значимого влияния ИВИ на оцениваемые показатели, которые не отличались от таковых в группе «МС». Исключение составил уровень инсулина через 120 мин после глюкозной нагрузки, который существенно снижался в сравнении с необработанными МС-крысами (табл. 1). Было показано слабо выраженное восстановление площади панкреатических островков, которое в группе «МСИ» было на 35% выше такового в группе «МС» (табл. 2).

Наибольший интерес представляло совместное применение метформина и ИВИ, поскольку в этом случае отмечали наиболее выраженное восстановление всех оцениваемых параметров, включая число и площадь панкреатических островков (табл. 1, 2). Группа «МСМИ» ни по одному показателю не отличалась от контрольных крыс, но по большинству показателей значимо отличалась от группы «МС» (табл. 1, 2).

Ранее мы показали, что совместное применение метформина и ИВИ эффективно при коррекции метаболических и гормональных показателей при диета-индуцированном метаболическом синдроме у крыс [12]. Выраженный восстанавливающий эффект такой комбинированной терапии, как мы полагаем, обусловлен «взаимодополняемостью» метформина и ИВИ. Метформин, который легко проникает в мозг через гематоэнцефалический барьер, нормализует энергетику клеток в мозге и на периферии, улучшая, тем самым, углеводный и липидный обмен, а также повышает их

чувствительность к инсулину и лептину, предотвращая инсулиновую и лептиновую резистентность [13,14]. В свою очередь, ИВИ, поступая непосредственно в мозг, нормализует инсулиновые сигнальные пути в гипоталамусе и других отделах мозга, ослабленные вследствие снижения уровня инсулина в ЦНС или снижения активности компонентов этих путей [15,16]. Все это положительно влияет на центральную инсулиновую регуляцию периферического метаболизма и функций нервной, эндокринной и других систем организма. Нормализация энергетического баланса нервных клеток метформином неизбежно приводит к повышению эффективности их регуляции ИВИ, что, вероятно, и лежит в основе наблюдаемого нами улучшающего эффекта при совместном применении этих препаратов.

Таким образом, нами впервые показано, что у взрослых самцов крыс с метаболическими нарушениями, вызванными ограничением грудного вскармливания в раннем постнатальном периоде, имеются не только метаболические дисфункции, но и снижена площадь панкреатических островков, что является причиной парадоксального отсутствия у них гиперинсулинемии, характерной для МС. При этом длительное лечение с помощью метформина или его комбинации с ИВИ в значительной степени или полностью восстанавливает эти показатели, что может указывать на перспективы их применения с целью нормализации метаболических и гормональных нарушений, развившихся вследствие дефицита грудного вскармливания в раннем онтогенезе.

Финансирование. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования России (соглашение № 075-15-2022-296 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития национального центра мирового уровня «Павловский центр»).

Все эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals»

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Lisboa P. C., Miranda R. A., Souza L. L., Moura E. G. Can breastfeeding affect the rest of our life? // Neuropharmacology. 2021. Vol. 200. P. 108821.

2. Picó C., Reis F., Egas C., Mathias P., Matafome P. Lactation as a programming window for metabolic syndrome // Eur. J. Clin. Invest. 2021. Vol. 51. No 5. P. e13482.
3. Leghi G. E., Netting M. J., Lai C. T., Narayanan A., Dymock M., Rea A., Wlodek M. E., Geddes D. T., Muhlhausler B. S. Reduction in Maternal Energy Intake during Lactation Decreased Maternal Body Weight and Concentrations of Leptin, Insulin and Adiponectin in Human Milk without Affecting Milk Production, Milk Macronutrient Composition or Infant Growth // Nutrients. 2021. Vol. 13. No 6. P. 1892.
4. Шпаков А. О., Деркач К. В., Суркова Е. В., Беспалов А. И. Перспективы применения интраназально вводимого инсулина для коррекции метаболических и гормональных нарушений при сахарном диабете и метаболическом синдроме // Проблемы эндокринологии. 2019. Т. 65. № 5. С. 389–395.
5. Kononova Y. A., Likhonosov N. P., Babenko A. Y. Metformin: Expanding the Scope of Application-Starting Earlier than Yesterday, Canceling Later // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. No 4. P. 2363.
6. Tulipano G. Integrated or Independent Actions of Metformin in Target Tissues Underlying Its Current Use and New Possible Applications in the Endocrine and Metabolic Disorder Area // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. No 23. P. 13068.
7. Derkach K. V., Bakhtyukov A. A., Romanova I. V., Zorina I. I., Bayunova L. V., Bondareva V. M., Morina I. Yu., Roy V. K., Shpakov A. O. The effect of metformin treatment on the basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus // Andrologia. 2020. Vol. 52. No 11. e13816.
8. Bakhtyukov A. A., Derkach K. V., Sorokoumov V. N., Stepochkina A. M., Romanova I. V., Morina I. Yu., 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 // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 23. No 1. P. 198.
9. Derkach K. V., Ivantsov A. O., Sukhov I. B., Shpakov A. O. Restoration of hypothalamic signaling systems as a cause of improved metabolic parameters in rats with neonatal diabetes model during treatment with bromocryptine mesylate // Cell Tissue Biol. 2017. Vol. 11. No 3. P. 234–241.
10. Lima Nda S., de Moura E. G., Passos M. C., Nogueira Neto F. J., Reis A. M., de Oliveira E., Lisboa P.C. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and

leptin resistance in adult rat offspring // Br. J. Nutr. 2011. Vol. 105. No 9. P. 1405-1413.
11. Francisco F. A., Barella L. F., Silveira S. D. S., Saavedra L. P. J., Prates K. V., Alves V. S., Franco C. C. D. S., Miranda R. A., Ribeiro T. A., Tófolo L. P., Malta A., Vieira E., Palma-Rigo K., Pavanello A., Martins I. P., Moreira V. M., de Oliveira J. C., Mathias P. C. F., Gomes R. M. Methylglyoxal treatment in lactating mothers leads to type 2 diabetes phenotype in male rat offspring at adulthood // Eur. J. Nutr. 2018. Vol. 57. No 2. P. 477-486.
12. Деркач К. В., Бондарева В. М., Басова Н. Е., Кузнецова Л. А., Шпаков А. О. Совместное применение метформина и интраназального инсулина нормализует чувствительность к глюкозе и гормональный статус у крыс с диабетом 2 типа // Интегративная физиология. 2021. Т. 2. № 4. С. 399–411.
13. Dludla P. V., Nkambule B. B., Mazibuko-Mbeje S. E., Nyambuya T. M., Mxinwa V., Mokgalaboni K., Ziqubu K., Cirilli I., Marcheggiani F., Louw J., Tiano L. Adipokines as a therapeutic target by metformin to improve metabolic function: A systematic review of randomized controlled trials // Pharmacol. Res. 2021. Vol. 163. P. 105219.
14. Ning P., Luo A., Mu X., Xu Y., Li T. Exploring the dual character of metformin in Alzheimer's disease // Neuropharmacology. 2022. Vol. 207. P. 108966.
15. 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. 1. No 3. P. FSO25.
16. Hallschmid M. Intranasal insulin // J. Neuroendocrinol. 2021. Vol. 33. No 4. P. e12934.

© Деркач К.В., Иванцов А.О.,
Бондарева В.М., Шпаков А.О., 2022

УДК: 621.373.9, 530.182, 004.942
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.11

ВОЗБУЖДЕНИЕ АБСАНСА В РАДИОТЕХНИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ТАЛАМО-КОРТИКАЛЬНОЙ СЕТИ МОЗГА

© Егоров Н.М.[1,2]*, Кульминский Д.Д.[1,3], Сысоев И.В.[1,4], Пономернко В.И.[1,4], Сысоева М.В.[1,2]

[1] Саратовский филиал Института радиотехники и электроники (СФ ИРЭ) им. В.А.Котельникова РАН, Саратов, Россия

[2] Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., Саратов, Россия

3 Университет «Сириус», Сочи, Россия

4 Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

* egorovnm@sstu.ru

Аннотация. Данная работа посвящена аппаратной реализации экспериментальной установки по моделированию таламокортикальной сети головного мозга, основанной на сети из радиотехнических осциляторов ФитцХью-Нагумо. Была подтверждена возможность возбуждения пик-волнового разряда в иерархически организованной сети осцилляторов. Исследован переход рассматриваемой сети в автоколебательный процесс через бифуркацию из сгущения фазовых траекторий. Было исследовано влияние полярности связей на характерные особенности динамики сети.

Ключевые слова: абсанс, моделирование, пик-волновой разряд, генератор.

EXCITATION OF ABSENCE IN THE RADIOENGINEERING MODEL OF THE THALAMO-CORTICAL NETWORK OF THE BRAIN

Egorov N.M.[1,2]*, Kulminskiy D.D.[1,3], Sysoev I.V.[1,4], Ponomarenko V.I.[1,4], Sysoeva M.V.[1,2]

[1] Saratov Branch of the Kotel'nikov Institute of Radioengineering and Electronics of Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia
[2] Yuri Gagarin State Technical University of Saratov, Saratov, Russia
[3] Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia
[4] Saratov State University, Saratov,Russia
* egorovnm@sstu.ru

Abstract. This work is devoted to the hardware implementation of an experimental setup for modeling the thalamocortical network of the brain, based on a network of FitzHugh-Nagumo radio oscillators. The possibility of excitation of a peak-wave discharge in a hierarchically organized network of oscillators was confirmed. The transition of the network under consideration to a self-oscillatory process through a bifurcation from a condensation of phase trajectories is studied. The influence of the polarity of links on the characteristic features of the network dynamics was investigated.

Keywords: Absense, modelling, spike-wave discharge, generator.

Введение

В настоящее время доказан тот факт, что сложные сетевые взаимодействия могут обусловливать функционирование самых различных природных и техногенных объектов, а девиации в сетях – переключать режим работы от нормальной динамики к патологической. [1, 2]. Эпилепсия является одним из наиболее распространённых и социально значимых заболеваний, по большей мере обусловленное патологическими структурно-функциональными связями внутри коры и между корой и глубокими структурами мозга, в основном таламусом [3] и гиппокампом [4].

Традиционно процесс изучения процессов в биосистемах разделён на несколько этапов: первичное наблюдение, эксперимент, съём и анализ экспериментальных данных, синтез математических моделей. Изучение большинства форм эпилепсии в настоящее время основывается на анализе экспериментальных данных электромагнитной активности мозга и дальнейшем воспроизведении

полученных эффектов в моделях. Для пик-волновых разрядов (проявление приступов абсансной эпилепсии на электроэнцефалограммах) эти этапы в основном пройдены к настоящему времени [5-8].

Построение моделей в виде радиотехнических схем представляет собой следующий важный этап на пути испытания идей и выводов, заложенных в построенные ранее математические модели. В первую очередь, таким образом можно проверить грубость модельных представлений: не является ли искомый режим работы «хрупким», существующим только в малой области параметров, который практически невозможно поймать в реальном эксперименте, также имитационная модель позволяет оценить влияние шумов, неидеальности элементов, на конечное поведение системы. Радиотехнические модели неоднократно использовались ранее для моделирования биологических объектов различной природы, в том числе отдельных нейронов и нейронных сетей [9-11]. В работе [12] показано, что переходные процессы в виде пик-волновых разрядов можно моделировать в больших (около 500 элементов) сетях математических нейронов. Переходный процесс, инициируемый кратковременным внешним раздражителем, прекращается сам по себе без какой-либо внешней системы управления, что соответствует современным представлениям [13].

Ранее в работе [14] была предложена радиотехническая реализация иерархической нейронной сети – мезомасштабной модели таламо-кортикальной сети мозга. Было показано, что предложенная модель способна воспроизводить возникновение пик-волновых разрядов, характерных для абсансной эпилепсии. Также, в работе [14] было показано, что пик-волновой разряд может рассматриваться как длительный переходной процесс, который спонтанно заканчивается без каких-либо дополнительных механизмов прекращения разряда. Во время переходного процесса система показывает достаточно регулярные колебания. Появление подобного поведения в системе является результатом сетевого взаимодействия и не проявляется при рассмотрении одного элемента. Так как модель должна сохранять биологический смысл, произвольные связи между элементами не разрешены, поэтому минимальное число элементов сети, необходимое для получения необходимого режима: 14 нейронов.

Целью настоящей работы является представление аппаратной реализации модели таламо-кортикальной сети головного мозга для воспроизведения пик-волновых разрядов в виде ансамбля радиотехнических генераторов ФитцХью-Нагумо. Было показано, что

небольшие изменения в архитектуре связей между нейронами может значительно повлиять на длину и возможность возбуждения пик-волнового разряда, воспроизводя неидеальную повторяемость, известную из биологических исследований.

Материалы и методы

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

В качестве отдельного узла сети использовались системы ФитцХью-Нагумо, каждая из которых описывается модельным упрощённым модельным уравнением, предложенным в [15]. Элементы сети были связаны простой связью, само уравнение нейрона следующее:

$$\varepsilon \dot{u}_i(t) = u_i(t) - \frac{u_i^3(t)}{3} - v_i(t) + \sum_{j \neq i} k_{ij} u_j,$$
$$\dot{v}_i(t) = u_i(t) + a_i,$$

где $u(t)$ и $v(t)$ — переменные, качественно соответствующие трансмембранному напряже- нию и переменной активации ионного тока, соответственно; ε — параметр соотношения временных масштабов, характеризующий относительную скорость активации (деактива- ции) ионного тока; k_{ij} — коэффициент связи, a — пороговый параметр системы, который может принимать значения из отрезка $a \in [0; 2]$.

При выборе типов клеток для моделирования мы руководствуемся сформулированным ранее принципы [16, 17]. Далее мы также следуем обозначениям, использованным в [12, 18], вводя краткие обозначения для каждого типа клеток, задействованных в модели: корковые интернейрон IN (1 элемент), корковые пирамидные клетки PY (4 элемента), таламокортикальные клетки TC (4 элемента), ретикулярные клетки таламуса RE (4 элемента), внешний входной (тройничный нерв) нейрон NT (1 элемент). NT нейрон может возбудить (положительная связь, т. е. $k_{ij} > 0$) одну клетку TC, клетки TC возбуждают все другие типы клеток, кроме самих себя и NT. PY клетки могут возбуждать клетки всех остальных типов, кроме NT, но включая клетки того же типа. RE клетки ингибируют (отрицательная связь, т. е. $k_{ij} < 0$) некоторые клетки всех других типов, кроме клеток NT, и IN могут тормозить только клетки PY. Схематическое изображение устройства связей показано на рис. 1.

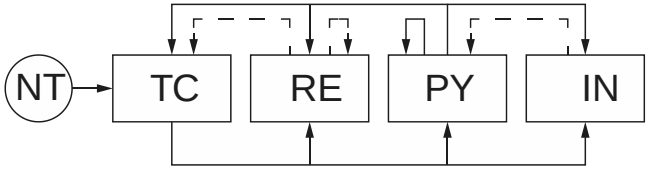


Рис. 1. Структурная схема модели таламо-кортикальной сети головного мозга. Сплошные линии – положительные (возбуждающие) связи, штриховые линии – отрицательные (тормозные) связи.

В соответствии с принципами, по которым строятся мезомасштабные модели, каждый отдельный нейрон моделирует собой группу близких нейронов. Такой подход аналогичен подходу, ранее распространённому в вакуумной СВЧ электронике, где весь электронный поток в приборах О-типа заменялся малым числом взаимодействующих частиц [19], что с одной стороны делает задачу вы- числительно решаемой, а с другой стороны позволяет моделировать взаимодействия между отдельными элементами (электронами или нейронами), важные для физики процесса.

АППАРАТНАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ

Принципиальная радиотехническая схема такого нейрона была разработана в [11] и смоделирована в ансамбле таких же нейронов в [14] на основе программного обеспечение National Instruments Multisim, электрическая схема данного осциллятора представлена на рис. 2.

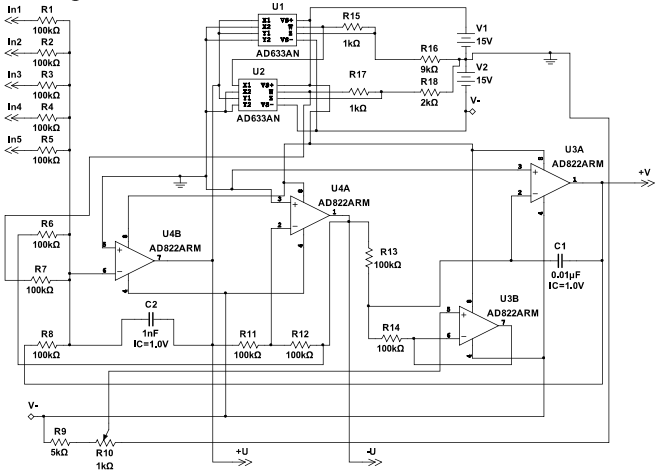


Рис. 2. Электрическая схема осциллятора ФитцХью-Нагумо.

Схема содержит два аналоговых умножителя U1 и U2 и два сдвоенных операционных усилителя U3, U4. Элементы U4B и U3A выполняют функцию интеграторов. Их выходные напряжения обозначены как +U и +V соответственно (они соответствуют переменным u, v в уравнении). На элементе U4A реализован инвертирующий усилитель с коэффициентом усиления −1, на его выходе мы имеем −U. Кубическое преобразование выполняется умножителями. Повторитель U3B предназначен для подключения к схеме потенциометра R10, напряжение на среднем выводе которого эквивалентно A. Входы In1−In5 принимают воздействия от других нейронов. Резисторы Rin = R1−R5 отвечают за силу связи k между нейронами, которая рассчитывается через следующее соотношение:

$$k = \frac{R_6}{R_{in}}.$$

В ходе выполнения данного исследования была разработана и реализована экспериментальная установка. Данная установка представляет собой ансамбль из 14 спаянных осцилляторов ФитцХью-Нагумо, соединённых в сеть. Архитектура связей и оцифровка осуществлялась с помощью компьютера и подключённого к нему модуля сбора данных PXIe-8840 с частотой дискретизации 10 кГц. На рис. 3 показана установка, не подключенная к питанию и модулю сбора данных.

Рис. 3. Экспериментальная установка таламо-кортикальной сети головного мозга с внешним входом, состоящая из 14 генераторов ФитцХью-Нагумо.

Результаты и обсуждение

В данной работе аппаратно реализована экспериментальная установка, имитирующая электромагнитное поведение таламо-кортикальной сети при наличии патологии в виде абсансной эпилепсии. Для сети были получены различные режимы работы, такие как автоколебательный режим и режим вынужденных колебаний. Проведено сравнение результатов имитационного моделирования таламо-кортикальной сети мозга радиотехнической реализацией в симуляторе цепей и спаянном на реальных компонентах. В результате эксперимента, были записаны временные реализации поведения установки, подобного пик-волновому разряду, одна из таких реализаций отображена на рис. 4.

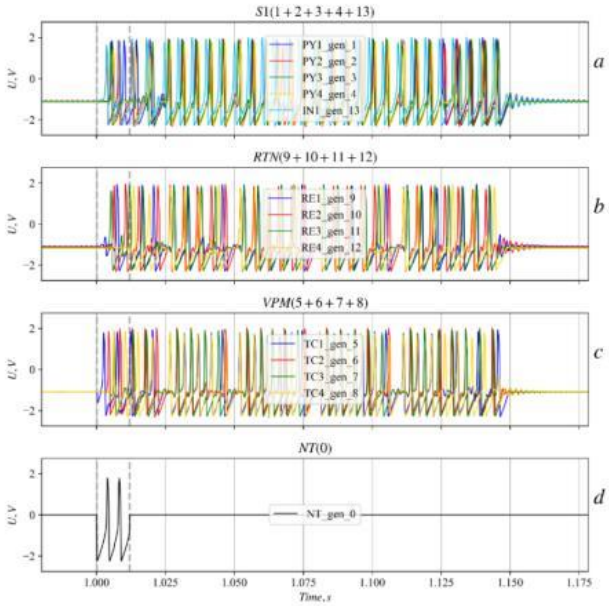


Рис. 4. Временные ряды для отдельных нейронов. PY – пирамидальные клетки, IN – интернейроны, RE – ретикулярные клетки, TC – таламокортикальные клетки, NT – тройничный нерв (внешнее воздействие на сеть).

Исследован переход рассматриваемой сети в автоколебательный процесс через бифуркацию из сгущения фазовых траекторий. Было исследовано влияние полярности связей на характерные особенности динамики сети.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 21-72-00015.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. S. Boccaletti, V. Latora, Y. Moreno, M. Chavez, D.-U.Hwang. Phys. Reports, 424 (4–5), 175 (2006).
2. О.В. Масленников, В.И. Некоркин. УФН, 187, 745 (2017). [O.V. Maslennikov, V.I. Nekorkin. Phys. Usp., 60, 694 (2017).]
3. A. Luttjohann, G. van Luijtelaar. Frontiers in Physiology, 6, 16 (2015).
4. E.H. Bertram. Epilepsia, 38 (1), 95 (1997).
5. Coenen A., van Luijtelaar G. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. Behavioral Genetics. 2003;33(6):635–655. DOI: 10.1023/A:1026179013847
6. Вольнова А.Б., Ленков Д.Н. Абсансная эпилепсия: механизмы гиперсинхронизации нейронных ансамблей. Медицинский академический журнал. 2012;12(1):3-15. 3. L¨uttjohann A., van Luijtelaar G. The dynamics of cortico-thalamocortical interactions at the transition from pre-ictal to ictal LFPs in absence epilepsy. Neurobiology of Disease. 2012; 47(1): 49-60.
7. Sysoeva M., Luttjohann A., van Luijtelaar G., Sysoev I. Dynamics of directional coupling underlying spikewave discharges. Neuroscience. 2016; 314:75–89. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.044
8. Sysoeva M., Vinogradova L., Kuznetsova G., Sysoev I., van Rijn C. Changes in corticocortical and corticohippocampal network during absence seizures in WAG/Rij rats revealed with time varying Granger causality. Epilepsy and Behavior. 2016; 64:44–50. DOI: 10.1016/j.yebeh.2016.08.009
9. Thomas A. Journal of Physics D: Applied Physics. 2013;46(9): 093001 DOI: 10.1088/0022-3727/46/9/093001
10. Babacan Y., Kacar F., Gurkan K. A spiking and bursting neuron circuit based on memristor. Neurocomputing. 2016;203:86-91. DOI: 10.1016/j.neucom.2016.03.060
11. Kulminskiy D.D., Ponomarenko V.I., Prokhorov M.D., Hramov A.E. Synchronization in ensembles of delay-coupled nonidentical neuronlike oscillators. Nonlinear Dynamics. 2019. 98(1):735-748. DOI: 10.1007/s11071-019-05224-x

12. Rabinovich,M.I., Trubetskov, D.I.:Oscillatwave. In: Linear and nonlinear systems, p. 577. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1989)
13. Egorov,NM., Ponomarenko,VI., Sysoev, IV., Sysoeva,MV.: Epileptiform activity generation by an ensemble of simplified electronic FitzHugh–Nagumo oscillators connected by a linear couplings. Proceedings of 5th Scientific School Dynamics of Complex Networks and their Applications (DCNA), (2021): 65–68, https://doi.org/10.1109/ DCNA53427.2021.9586902
14. Егоров Н.М., Пономаренко В.И., Сысоев И.В., Сысоева М.В. Журнал технической физики. 2021. 91(3):519-528. DOI: 10.21883/JTF.2021.03.50532.237-20
15. Dahlem M.A., Hiller G., Panchuk A., Sch¨oll E. Dynamics of delay-coupled excitable neural systems. International Journal of Bifurcation and Chaos. 2009. 19:745-753. DOI: 10.1142/S0218127409023111
16. Medvedeva, T.M., Sysoeva, M.V., Lüttjohann, A., van Luijtelaar, G., Sysoev, I.V.: Dynamical mesoscale model of absence seizures in genetic models. PLoS One (2020). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239125
17. Abbasova, K.R., Chepurnov, S.A., Chepurnova, N.E., van Luijtelaar,G.: The role of perioral afferentation in the occurrence of spike-wave discharges in the WAG/Rij model of absence epilepsy. Brain Res 1366, 257–262 (2010). https:// doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.007
18. Gonchenko, A.S., Gonchenko, S.V., Kazakov,A.O.,Kozlov, A., Bakhanova, Y.V. (2019) Mathematical theory of dynamical chaos and its applications: Review Part 2 Spiral chaos of three-dimensional flows Izvestiya VUZ. Appl Nonlin Dyn. https://doi.org/10.18500/0869-6632-2019-27-5-7-52
19. Вайнштейн Л. А. Электронные волны в замедляющей системе. Радиотехника и электроника. 1957. Т. 3. С. 688.

© Егоров Н.М., Кульминский Д.Д., Сысоев И.В., Пономернко В.И., Сысоева М.В., 2022

УДК: 616.853.4
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.12

РАЗРАБОТКА МЕТОДА АВТОМАТИЧЕСКОЙ РАЗМЕТКИ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ У КРЫС-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

© Ершова А.С.[1]*, Грищенко А.А.[1], Сулейманова Е.М. [2], Виноградова Л.В.[2], Сысоев И.В.[1,2]
[1] Саратовский Государственный Университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия
[2] Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, г. Москва, Россия
* anshova2002@gmail.com

Аннотация. При изучении абсансной эпилепсии экспериментальную работу традиционно осуществляют на крысах с генетической предрасположенностью к заболеванию (линии WAG/Rij и GAERS), поскольку они дают производить хирургические вмешательства и записывать сигналы глубоких структур мозга. Пик-волновые разряды у этих животных возникают спонтанно. Альтернатива генетическим — фармакологические модели, которые хороши тем, что позволяют моделировать эпилептические разряды у исходно здоровых животных благодаря однократной интенсивной стимуляции. Чаще всего используются модели животных, разряды у которых вызваны введением низких доз пентилентетразола (ПТЗ). Именно на этих моделях часто исследуют антиэпилептические препараты. В данной работе был разработан и реализован метод автоматической разметки пик-волновых разрядов у крыс с вызванными системным введением ПТЗ абсансами. Также была проведена проверка чувствительности и специфичности разработанного метода.

Ключевые слова: абсансная эпилепсия; пик-волновые разряды; пентилентетразол; автоматическое обнаружение приступов.

ENGINEERING OF A METHOD FOR MARKING A SPIKE-WAVE DISCHARGE PATTERNS IN PENTYLENETETRAZOLE RAT MODEL

Ershova A.S[1]*, Grishchenko A.A.[1], Suleymanova E.M.[2], Vinogradova L.V.[2], Sysoev I.V.[1,2]

[1] Saratov State University, Saratov, Russia

[2] Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Science, Moscow, Russia

* anshova2002@gmail.com

Abstract. In the study of absence epilepsy, experimental work is traditionally carried out on rats with a genetic predisposition to the disease (WAG/Rij and GAERS lines), since they allow surgical interventions to be performed and signals from deep brain structures to be recorded. Spike-wave discharges in these animals occur spontaneously. An alternative to genetic ones is pharmacological models, which are allow modeling epileptic discharges in initially healthy animals due to a single intense stimulation. The most commonly used animal models are those in which discharges are induced by administration of low doses of pentylenetetrazole (PTZ). It is on these models that antiepileptic drugs are often investigated. In this work, we developed and implemented a method for automatic marking of spike-wave discharges in rats with absence seizures induced by the systemic administration of PTZ. The sensitivity and specificity of the developed method were also tested.

Keywords: absence epilepsy; spike-wave discharges; pentylenetetrazole; automatic discharge detection.

Введение

Эпилепсия на данный момент стала одним из самых распространенных расстройств нервной системы, которое в значительной мере влияет на деятельность человека. В частности абсансная эпилепсия – заболевание головного мозга, характеризующееся специфическими генерализованными несудорожными приступами типа «пик-волна» в электроэнцефалограмме с частотой 3Гц у людей и 5-11Гц [2] у животных различных линий. У людей заболевание почти всегда встречается среди детей и подростков. Больные не имеют показаний для инвазивных исследований и хирургического вмешательства, поэтому получить информации о механизмах этого заболевания

сложно. В связи с этим часто прибегают к изучению мозга, основанного на применении пентилентетразола (ПТЗ). Это вещество способствует появлению кратковременных приступов при малых дозах.

Зачастую анализ полученных данных производится вручную, что является не эффективным при наличии большого количество данных. Для этого был разработан алгоритм автоматического обнаружения приступов по длинным записям сигналов потенциалов мозга. Результатом стала рабочая программа, способная выделять разряды автоматически.

Материалы и методы

Эксперименты проводились в соответствии со всеми принципами Европейского Сообщества по проведению экспериментов над животными, одобренными этической комиссию по экспериментам, на 6-7 месячных самцах крыс линии Wistar, полученных из питомника «Столбовая» в Московской области. Активность мозга регистрировалась с помощью электродов, имплантированных в симметричные области фронтальной и затылочной коры обоих полушарий. Электроды вживлялись за несколько недель до экспериментов. В качестве индифферентного электрода использовали стальной винт, расположенный над мозжечком. Регистрацию электрической активности коры в диапазоне 1-100 Гц (частота дискретизации 1кГц) проводили в условиях хронического эксперимента на бодрствующих свободно подвижных животных. Использовали усилитель и АЦП (E14-440, L-Card, Россия), а также программное обеспечение PowerGraph (ООО «Интероптика-С», Россия). Для индукции разрядов использовали внутрибрюшное введение конвульсанта пентилентетразола (ПТЗ) в дозе 40 мг/кг. По окончании эксперимента проводили гистологический анализ для определения локализации регистрирующих электродов.

В данной работе рассматривались записи 9 животных, средняя длительность записей составляет 1-2 часа. Типичный разряд представлен на (рис. 1).

Так как записи длительные, всегда есть высокоамплитудные артефакты (движений, компенсации и др.), которые не позволяют провести адекватный анализ, кроме того, чтобы перейти к анализу данных нужно выделить сами разряды от фоновой активности и определить среднюю продолжительность разрядов у данной модели животных. Для автоматического обнаружения приступов в данной работе был разработан простой алгоритм автоматического определения

пик-волновых разрядов. Сначала используя скользящее окно длиною 2 с [3], рассчитывалось скользящее среднее, которое вычиталось из сигнала, чтобы получить детрендированный ряд. Затем, ряд переводился в спектральное представление и все компоненты на частотах 50 Гц удалялись — так устраняется сетевая наводка. Затем осуществлялось обратное Фурье-преобразование.

В полученных рядах выделялись моменты особо быстрого изменения сигнала (скачки), которые должны соответствовать первой части комплекса пик-волна.

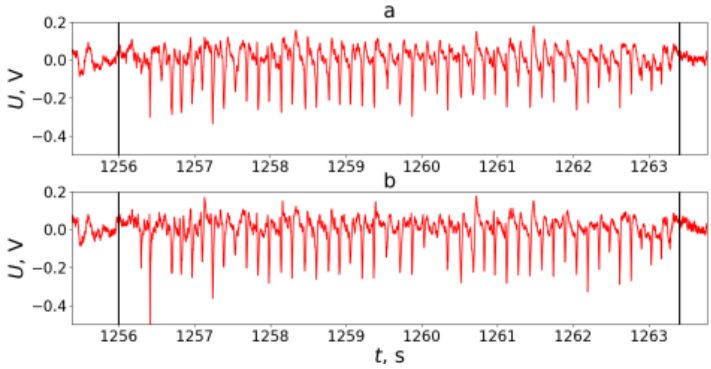


Рис. 1. a – разряд правой лобной коры крысы под номером 8, b – спектрограмма правой лобной коры соответствующего разряда, c – разряд левой лобной коры крысы под номером 8, d – спектрограмма левой лобной коры соответствующего разряда. На всех графиках, чёрная вертикальная линия означает начало и конце разряда.

Сначала выбирались индексы начала активности и конца, затем проводилась проверка, которая объединяла разряды, которые могли перекрывать друг друга. Далее нужно было сопоставить выделенные разряды со временем, когда они произошли. А затем, с помощью анализа выделенных фрагментов удалялись артефакты. Таким образом были получены значения времени начала и конца разрядов.

В результате анализа 2 полушарий коры головного мозга животных удалось выделить эпилептические приступы длительностью

от 1 с, а также более 3 с у животных, что соответствует международно принятому определению пик-волновых разрядов [3,4]. Средняя их частота составляла 7 Гц. Пример разряда, детектированного алгоритмом в сигнале лобной коры правого и левого полушария, показан на рисунке 1.

Результаты и обсуждение

Для проверки работоспособности этого метода детектирования связности двух систем была посчитана специфичность и чувствительность. Чувствительность определяется тем, какой процент реально существующих разрядов может детектировать метод (табл. 1). Под специфичностью понимается способность метода избегать ложноположительных результатов. Таким образом хорошая специфичность означает относительно малое число найденных разрядов, которые ими не являются, а плохая – большое их число [6].

Таблица 1. Таблица чувствительности. По горизонтали отложен номер крысы, последний столбец – среднее значение; вертикальные ряды обозначают для какого полушария коры была посчитана чувствительность. Таблица показывает количественные значения чувствительности в процентах.

	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	среднее
Левая кора	91,6	43,1	97,8	98	92	64,4	95	96	90	6,32
Правая кора	87,8	40	95,8	98	90	9,06	93	98	89	7,85

Так, посчитав специфичность (табл. 2) в процентах, наглядно стало видно сколько разрядов выделил алгоритм из всего ряда. Значения оказались достаточно высокими, что говорит о достаточной точности. Это означает, что алгоритм программы выбирал разряды или нечто похожее на них с большой точностью. В среднем алгоритм выбирал из сигнала разряды с точностью от 70-85%.

Таблица 2. Таблица специфичности._По горизонтали отложен номер крысы, последний столбец – среднее значение; вертикальные ряды обозначают для какого полушария коры была посчитана специфичность. Таблица показывает количественные значения специфичности в процентах.

	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№ 7	№8	№9	сред нее
Левая кора	84, 99	95, 45	92, 31	84, 74	84, 44	98, 28	88, 75	71, 64	86, 57	87, 43
Правая кора	85, 06	100	93, 33	82, 83	74, 49	92, 31	87, 82	71, 01	84, 50	85, 71

Посчитав чувствительность (табл.1) в процентах, можно сравнить показатели между лобной коры правого и левого полушария. Для расчёта была найдена разность между всеми найденными разрядами к истинным разрядам. Низкие значения у крысы 2 и 6 связаны прежде всего с большим количеством артефактов, которые выделял алгоритм. Остальные же значения оказались также достаточно высокими. Это означает, что алгоритм достаточно точно выделял разряды из сигнала. Так достаточно высокие показателях чувствительности и специфичности показывают, что алгоритм выделяет истинные разряды достаточно точно, несмотря на обилие артефактов в некоторых сигналов. Для более тщательно проверки, сигналы были просмотрены вручную, без использования алгоритма. Этот способ проверки подтвердил работоспособность алгоритма.

Работа поддержана грантом РНФ 22-15-00327.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Вольнова А.Б., Ленков Д.Н. Абсансная эпилепсия: механизмы гиперсинхронизации нейронных ансамблей // Медицинский академический журнал. 2012. Т. 12. № 1. С. 7-19.
2. Klioueva I. A., van Luijtelaar E. L. J. M., Chepurnova N. E., Chepurnov S. A. PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain // Physiology & Behavior. 2001. Vol. 72. No. 3. Pp. 421-426.
3. Ovchinnikov A., Lüttjohanna A., Hramov A., van Luijtelaar G. An algorithm for real-time detection of spike-wave discharges in rodents // Journal of Neuroscience Methods. 2010. Vol. 3(2), Pp.6-9.

4. Lüttjohann A., Fabene P. F., van Luijtelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats // Physiology & Behavior. 2009. Vol. 98(5), Pp. 579–586.
5. Lüttjohann A., van Luijtelaar G., Makarov V. V., Maksimenkoc V. A., Koronovskiic A. A., Hramov A. E. Methods of automated absence seizure detection, interference bystimulation, and possibilities for prediction in genetic absence models // Journal of Neuroscience Methods. 2015. Vol 4, Pp. 13-15.
6. Ситникова Е. Ю., Короновский А. А., Храмов А. Е. Анализ электрической активности головного мозга при абсанс-эпилепсии: прикладные аспекты нелинейной динамики // Известия Вузов. ПНД. 2011. Т. 19. №6. С.173-182.

© Ершова А.С., Грищенко А.А., Сулейманова Е.М.,
Виноградова Л.В., Сысоев И.В., 2022

УДК: 612.826.4
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.13

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА КИССПЕПТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В УСТАНОВКЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»

© Журавлева М.А.*, Инюшкин А.Н.
Самарский национальный исследовательский университет
имени академика С.П. Королева, г. Самара
* tkachevara@mail.ru

Аннотация. В статье представлены данные о влиянии антагониста киспептиновых рецепторов при интраназальном введении в субъективное дневное и ночное время на показатели активности самцов крыс в установке «Открытое поле». Активность животных, оценивалась по количеству пересеченных квадратов и секторов, времени нахождения в центре, центральных 2/3 поля и на периферии, длинному и короткому грумингам, засовыванию мордочки в отверстия, обнюхиванию, седации, ажитации, стойкам с опорой и без опоры. Исследование приведенных параметров дало статистически значимые различия, что подтверждает гипотезу о влиянии интраназальной доставки кисспептина на поведение крыс в условиях изменения режимов освещения. Анализ результатов, показал, что при воздействии антагониста активнее происходит поведенческая адаптация животных к нестандартным для них условиям, тем самым снижается уровень тревожности и стимулируется исследовательское поведение.

Ключевые слова: антагонист кисспептиновых рецепторов, биологические ритмы.

THE EFFECT OF KISSPEPTIN RECEPTOR ANTAGONIST ON THE BEHAVIOR OF RATS IN THE "OPEN FIELD" INSTALLATION

Zhuravleva M.A.*, Inyushkin A.N.
Samara National Research University, Samara, Russia
* tkachevara@mail.ru

Abstract. The article presents data on the effect of the antagonist of kispeptin receptors during intranasal administration during subjective daytime and nighttime on the activity indicators of male rats in the "Open Field" installation. The activity of animals was assessed by the number of intersected squares and sectors, the time spent in the center, the central 2/3 of the field and on the periphery, long and short grooming, thrusting the muzzle into the holes, sniffing, sedation, agitation, stands with support and without support. The study of these parameters gave statistically significant differences, which confirms the hypothesis about the effect of intranasal delivery of kisspeptin on the behavior of rats under conditions of changing lighting modes. Analysis of the results showed that when exposed to an antagonist, animals adapt more actively to non-standard conditions for them, thereby reducing the level of anxiety and increasing research behavior.

Keywords: antagonist of kisspeptin receptors, biological rhythms.

Введение

В организме всем живым существ, населяющих нашу планету, генерируется совокупность физиологических, биохимических и поведенческих циркадианных биоритмов, период которых приблизительно соответствует земным суткам [1]. В механизмах точной синхронизации главного циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра с 24-часовым периодом важную роль играют нейропептиды [2,3]. Одним из недавно открытых и активно изучающихся нейропептидов является кисспептин. Его открытие произошло в 1996 году, и изначально он рассматривался как супрессор метостазирования опухолей. Только в 2003 году была выявлена его важная роль в процессе полового созревания и фертильности у млекопитающих и человека [4]. Высокая концентрация данного вещества была обнаружена сначала в плаценте, а затем в яичниках и семенниках. В головном мозге основная эксперессия кисспептина происходит в ядрах гипоталамуса (аркуатное и антеровентральное перивентрикулярное ядра). Кисспептин непосредственно влияет на

ганадотропин релизинг гармон (ГнРГ), стимулируя его высвобождение. Кроме того, кисспептин стимулирует высвобождение лютеинизирующего гормона [5].

Центральное действие кисспептина реализуется через специфические KISS1 рецепторы, относящиеся к семейству родопсиновых рецепторов, сопряженных с G-протеинами. Механизм передачи сигнала с KISS1 рецептора в целом не отличается от такового у других рецепторов, ассоциированных с G-протеинами. Супрессия генов кисспептина позволила установить, что последствием этого является гипогонадотропный гипогонадизм. Введение экзогенного кисспептина стимулировало секрецию ГнРГ. Наличие полиморфизма в гене рецептора к кисппептину приводит к преждевременному половому созреванию [6]. Кисспептин также участвует в процессах, связанных с сезонным размножением [7]. Однако его влияние на поведение в настоящее время остается малоизученным [8].

Представленные в настоящей работе данные о влиянии антагониста киспептиновых рецепторов при его интраназальном введении в субъективное дневное и ночное время на показатели активности самцов крыс в установке «Открытое поле» позволяют оценить роль кисспептина в регуляции параметров поведенческой активности животных. Анализ полученных данных позволяет сделать выводы об изменении ориентировочно-исследовательского поведения и уровня тревожности крыс в условиях блокады кисспептиновых рецепторов, определить влияние кисспептина на адаптацию животных к изменяющимся условиям среды.

Материалы и методы

Экспериментальный протокол, использованный в работе, соответствовал существующим нормам гуманного обращения с животными и одобрен комиссией по биологической этике Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева. Наблюдения проводились на 12 самцах крыс Вистар массой 240-270 г. Животные содержались в условиях суточного режима освещения 12:12 ч. (свет:темнота) и получали пищу и питьевую воду ad libitum. Во время светлого периода освещённость в клетках составляла приблизительно 170 люкс.

Для изучения зависимости эффектов антагониста кисспептиновых рецепторов от момента введения в суточном цикле перед каждым наблюдением производили 4-часовой запаздывающий сдвиг режима освещения, что давало возможность моделировать шесть различных моментов экспериментального воздействия в суточном

цикле (ZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT18, ZT22; ZT0 соответствует моменту включения освещения) при неизменности момента воздействия в реальном времени (во всех случаях – 16 часов местного времени). Каждое наблюдение начиналось с 3-недельного периода адаптации к новому режиму освещения, после чего животным экспериментальной группы в один из шести моментов суточного цикла вводили интраназально билатерально в суммарном объеме 10 мкл 0,1 мМ антагониста кисспептиновых рецепторов P-234 (Sigma). Введение вещества производили в одно и то же время в течение трёх последовательных суток (троекратно). Животным контрольной группы аналогично вводили воду для инъекций.

Регистрацию поведенческих параметров проводили на свету (освещенность около 300 люкс) через 15 мин после интраназального введения растворов. Для этого крысу помещали в установку «Открытое поле» и в течение 10 минут производили видеорегистрацию поведения животного в установке с использованием камеры Panasonic HC-X810, установленной на штатив. Поведенческую активность крыс в тесте «Открытое поле» оценивали по количеству пересечённых квадратов и секторов, времени нахождения в центре, центральных 2/3 поля и на периферии, длинному и короткому грумингам, засовыванию мордочки в отверстия, обнюхиванию, седации, ажитации, стойкам с опорой и без опоры.

Исследованы различия между поведением животных экспериментальной и контрольной групп в различные моменты суточного цикла. Последующую обработку данных производили по полученной видеозаписи. Для оценки различий исследуемых показателей в ходе экспериментальных воздействий использовали t-тест или тест Манна-Уитни (в случаях несоответствия данных в выборках нормальному распределению или при неоднородности дисперсий). Нормальность распределения данных проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка, однородность дисперсий – с помощью теста Левена. Статистическую значимость определяли при помощи стандартных уровней, которые обозначали на графиках соответствующим количеством звездочек *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Результаты и обсуждение

Значимые статистические различия были получены в результате сравнения контрольной и экспериментальной групп в субъективное дневное и субъективное ночное время. Определяли такие параметры, как пересечение крысами квадратов в центре, 2/3 поля и на периферии.

Анализ пересечения 2/3 квадратов, показал уменьшение активности у животных экспериментальной группы по сравнению с контролем в субъективное дневное время (P=0,006). В субъективное ночное время в том же параметре статистически значимых различий выявлено не было. В экспериментальной группе при пересечении квадратов на периферии поля, активность животных уменьшилась в субъективное ночное время по сравнению с контролем (P=0,044). В субъективное дневное время в том же параметре значимых различий обнаружено не было. Исследование количества пересечений квадратов поля в центре дало статистически значимые различия в субъективное дневное время по сравнению с контролем (P=0,012). Однако в субъективное ночное время значимых различий между группами в данном параметре выявлено не было.

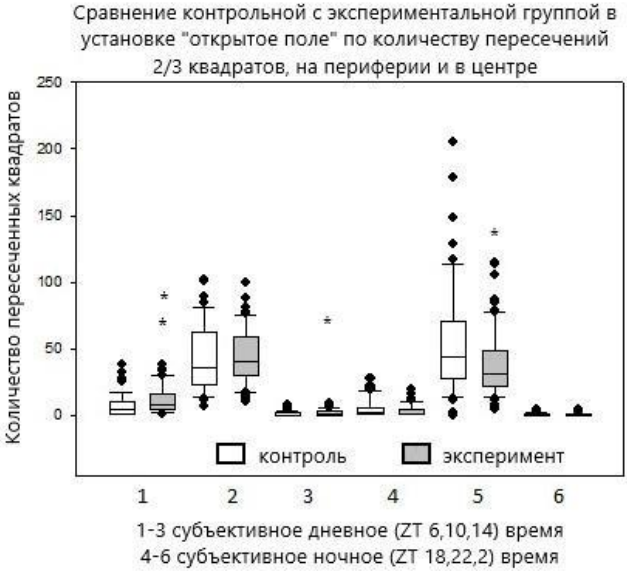


Рис. 1. Сравнительные данные контрольной с экспериментальной групп в установке «Открытое поле» по количеству пересечений 2/3 квадратов, на периферии и в центре в субъективное дневное (ZT 6,10,14) время и в субъективное ночное (ZT 18,22,2) время. Различия статистически значимы в субъективное дневное время по количеству пересечений 2/3 квадратов поля (P=0,006) и в центре (P = 0,012), а в ночное – на периферии (P = 0,044) : тест Манна-Уитни.

Не обнаружено статистически значимых различий в таких параметрах, как короткий и длинный груминг, обнюхивание, седация. В то же время засовывания мордочки и стойки без опоры в субъективное дневное время дали статистически значимые различия при увеличении количества действий животных в экспериментальной группе в обоих случаях (P=0,001 и P=0,002, соответственно). В субъективное ночное время в данных параметрах различий обнаружено не было.

Были получены статистически значимые результаты в ажитации с увеличением активности субъективное ночное время (P=0,002). В экспериментальной группе активность в субъективное дневное и в субъективное ночное время была примерно одинаковой в исследовании параметра «стойка с опорой», хотя медиана этого параметра в экспериментальной группе оказалась ниже, чем в контроле (P=0,032).

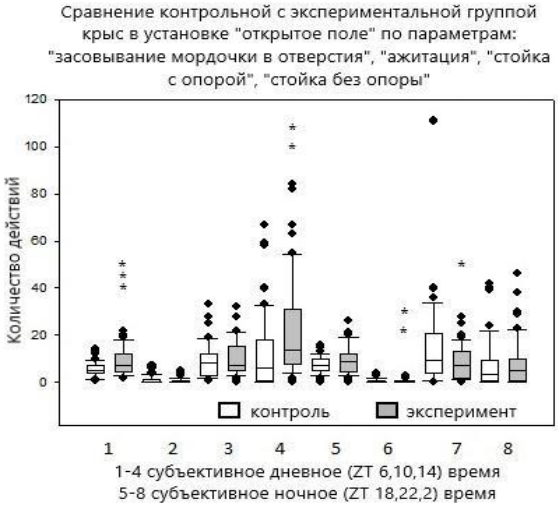


Рис. 2. Сравнительные данные контрольной с экспериментальной групп в установке «Открытое поле» по параметрам: «засовывание мордочки в отверстия», «ажитация», «стойка с опорой», «стойка без опоры» в субъективное дневное (ZT 6,10,14) время и в субъективное ночное (ZT 18,22,2) время. Различия статистически значимы в субъективное дневное время в параметре «засовывание мордочки в отверстия» (P=0,001) и «стойка без опоры» (P=0,002) а в ночное «ажитация» (P=0,002) и «стойка с опорой» (P=0,032): тест Манна-Уитни.

В данной работе было изучено влияние антагониста кисспептиновых рецепторов на поведение самцов крыс в установке «Открытое поле». Сравнивали эффекты вещества в различные моменты суточного цикла. Анализировали показатели активности животных по количеству пересеченных квадратов за 10-минутный интервал времени. Антагонист кисспептиновых рецепторов вводили интраназально, в течение трех последовательных суток, в один и тот же момент циркадианного цикла.

Пересечение 2/3 квадратов поля в субъективное дневное время, может указывать на увеличение исследовательской активности в необычный период суток и изменению биологических ритмов сна и бодрствования, так как крысы ведут преимущественно ночной образ жизни. Данное наблюдение подтверждается также снижением в экспериментальной группе активности в субъективное ночное время на периферии установки. Сравнительный анализ данных дневного и ночного периодов также указывает на адаптогенный потенциал и снижение тревожности исследуемых животных. Увеличение количества засовываний мордочки в отверстия и стоек без опоры в субъективные дневные часы и увеличение стоек с опорой и ажитации в ночные, показывает, что поведенческие эффекты антагониста кисспептиновых рецепторах зависят от времени момента его интраназального введения в циркадианном цикле.

Полученные данные подтверждают, что антагонист кисспептиновых рецепторов оказывает воздействие на поведение животных при инраназальном введении, а также модулирует активность у крыс по-разному в субъективное дневное и субъективное ночное время. Исследования так же подтверждают то, что вещество оказывает эффекты на биологические ритмы, изменяя периоды активности животных в разных временных интервалах. Предполагается, что при интраназальном введении антагониста кисспептиновых рецепторов, значительные количества данного вещества проходят непосредственно вдоль обонятельных и тройничных нервов, минуя гематоэнцефалический барьер и попадают непосредственно в гипоталамус, где локализованы циркадианные биологические часы [9,10].

Исследование эффектов блокады кисспептиновых рецепторов с изменением режимов освещения, представленное в настоящей работе, проводилось впервые. Оно может помочь в решении ряда актуальных задач, связанных с возможностью регулирования адаптогенного потенциала циркадианной системы, в купировании сезонных депрессий и инсомний, восстановлении биологических ритмов при перелетах и минимизировать проявления десинхроноза при трансмеридианных перелетах.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Бобок М.Н. Краснюк И.И., Козлова Ж. М. Регуляция биологических ритмов. Современные способы коррекции дисинхронозов // Международный научно-исследовательский журнал. 2020. №7 (97).
2. Губин Д.Г., Ветошкин А.С., Шуркевич Н.П., Гапон Л.И., Белозерова Н.В., Пошинов Ф.А. Хронобиологический и стандартный анализ данных суточного мониторирования артериального давления и частоты сердечных сокращений у вахтовиков ямала (п. Ямбург, Тюменская область) // Успехи современного естествознания. 2013. № 6. С. 17-33.
3. Красивина И.Г., Евгеньева А.В., Молоткова Н.С., Гущин А.С., Моденова И.А. Экзогенные и эндогенные факторы, влияющие на функциональные характеристики при пароксимальных нарушениях ритма сердца // Профилактическая медицина. 2016. №19 (2‑ 2). С. 43‑ 44.
4. Никитина И.Л., Юхлина Ю.Н., Васильева Е.Ю., Нагорная И.И. Кисспептиновые механизмы регуляции полового развития мальчиков: потенциал диагностики и терапии при задержке старта пубертата и гипогонадотропном гипогонадизме // Проблемы эндокринологии. 2018. № 64(5). С. 280‑ 285.
5. Чернуха Г. Е., Табеева Г. И., Гусев Д. В., Шмаков Р. Г. Кисспептин и репродуктивная система // Доктор.Ру. 2017. № 3 (132). С. 73–78.
6. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors // FEBS Lett. 1999. Vol. 446. Pp. 103-107.
7. Clarke, I.J., Caraty, A. Kisspeptin and Seasonality of Reproduction. In: Kauffman, A., Smith, J. (eds) Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology // Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, New York. 2013. Vol. 784.
8. Тиссен И.Ю., Чепик П.А., Лебедев А.А., Магаррамова Л.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Условная реакция предпочтения места кисспептина-10 // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2021. Т. 19. №1. С. 47-53.
9. Инюшкин А.Н., Мистрюгов К.А., Громова Д.С., Пугачёв Е.И., Беляков В.И., Инюшкина Е.М. Влияние инсулина на циркадианный ритм произвольной локомоторной активности крыс // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2011. №97(7). С. 678–689.
10. 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.

© Журавлева М.А., Инюшкин А.Н., 2022

УДК: 616.37-002
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.14

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ДЕСТРУКТИВНЫМ ПАНКРЕАТИТОМ И В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© Имаева А.К., Батыршина Э.Р., Фазлыахметова М.Я.
Башкирский государственный медицинский университет,
г. Уфа, Россия

Аннотация. Острый деструктивный панкреатит (ОДП) относится к тяжелой хирургической патологии, приводящей к летальным осложнениям. Целью исследования было проведение сравнительного анализа изменений, полученных при изучении материалов, полученных при патологоанатомических вскрытиях с экспериментальными данными. Показано, что данные клинико-лабораторных исследований, а также изменения в ткани поджелудочной железы носили сходный характер. Предложенная методика моделирования острого деструктивного панкреатита позволяет использовать полученные данные при анализе морфологических изменений в организме, а также может быть методом выбора в условиях решения научно-практических задач.

Ключевые слова: острый деструктивный панкреатит, эксперимент, патологоанатомическая диагностика.

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE PANCREAS IN PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS AND IN EXPERIMENT

Imaeva A.K., Batyrshina E.R., Fazlyakhmetova M.Ya.
Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
* alfia.imaeva@mail.ru

Abstract. Acute destructive pancreatitis (ADP) is a severe surgical pathology leading to fatal complications. The aim of the study was to conduct a comparative analysis of the changes obtained in the study of materials obtained during post-mortem autopsies with experimental data. It was shown that the data of clinical and laboratory studies, as well as changes in the pancreatic tissue were of a similar nature. The proposed method for modeling acute destructive pancreatitis makes it possible to use

the data obtained in the analysis of morphological changes in the body, and can also be the method of choice in solving scientific and practical problems.

Keywords: acute destructive pancreatitis, experiment, pathoanatomical diagnostics.

Введение

Несмотря на стремительное развитие панкреатологии, разработку обоснованных рекомендаций и протоколов ведения больных острым панкреатитом, остается много трудностей в установке правильного клинического диагноза на первых этапах госпитализации [1,4]. Немаловажной представляется своевременная диагностика ОДП при атипичных вариантах заболевания, что во многом обусловлено неравномерным распределением очагов повреждения железы в различных анатомических ее отделах [2,3]. Изучение морфологии этого заболевания с поражением прилежащей жировой ткани в эксперименте и определение путей распространения инфекции представляет научный интерес.

Материалы и методы

Проведен анализ медицинской документации, а также результатов патологоанатомического вскрытия 67 пациентов, умерших от осложнений острого деструктивного панкреатита. Моделирование острого деструктивного панкреатита у свиней (7 животных) осуществлялось по предложенной методике (Патент на изобретение №2668201). Исследования проводились согласно конвенции по защите домашних животных (№125 от 13.11.1987 г.) и были одобрены этическим комитетом БГМУ (№02-2016 от 18.02.2016 г.). Для подтверждения развития у экспериментальных животных ожидаемой патологии применялось ультразвуковое исследование органов брюшной полости и забрюшинной локализации с помощью ветеринарного ультразвукового сканера Ecoson 700W. Производился забор крови на общий анализ и биохимическое исследование. Также в процессе оценки изменений внутренних органов во время аутопсии производился забор кусочков тканей на гистологическое исследование. Кусочки ткани толщиной не более 0,5 мм помещались в емкость с 10%-ным водным раствором нейтрального формалина. Затем последовательно биоматериал обезвоживался и заливался в парафин. С помощью роторного микротома изготавливались гистологические срезы толщиной 5-6 мкм и после депарафинизации последние окрашивались гематоксилином и эозином.

С целью иммуногистохимического исследования кусочки ткани поджелудочной железы фиксировались в течение 24 часов в 10% растворе формалина забуференного фосфатами. Дальнейшая проводка и заливка в парафин осуществлялась по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 2 мкм изготавливались на микротоме «Sakura Accu-Cut® SRM™» (Япония) и помещались на стёкла с поли-L-лизиновым покрытием. Гистологические срезы подвергались депарафинизации ксилолом, с последовательной обработкой изопропиловым спиртом, а затем дистиллированной водой. Для оценки апоптоза панкреатоцитов исследовались иммуногистохимические маркеры ключевых точек генетической программы смерти клеток: белки Caspasa-3 и Bcl-2 (коммерческие наборы фирмы Diagnostic BioSystems Inc.). Также была определена пролиферативная активность панкреатоцитов путем иммуногистохимического определения маркера Ki 67 (Коммерческий набор фирмы Spring Bioscience). Демаскировка антигенов, дальнейшее иммунное окрашивание производилось наборами соответствующих фирм-производителей первичных антител с последующей докраской ядер квасцовым гематоксиллином и заключением срезов под покровное стекло. Оценка результатов иммуногистохимического исследования осуществлялась полуколичественным методом на световом микроскопе «Nikon Eclipse E400» при увеличении 400х и видеосистемы «TauVideo» с программой «Tay Морфология» на основе видеокамеры «Watec 221s». При этом анализировались 50 полей зрения в каждом препарате. Статистическую обработку данных производили в пакете прикладных программ STATISTICA V.7.0 («StatSoftInc», США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ данных функциональных методов исследования, в частности ультразвуковое исследование органов брюшной полости, рентгенологические исследования. При этом по данным медицинской документации, а также анализируя результаты исследования экспериментальных данных в полости сальниковой сумки часто выявлялось небольшое количество свободной жидкости, повышение эхогенности паренхимы поджелудочной железы, расширение просвета главного панкреатического протока и его ветвей.

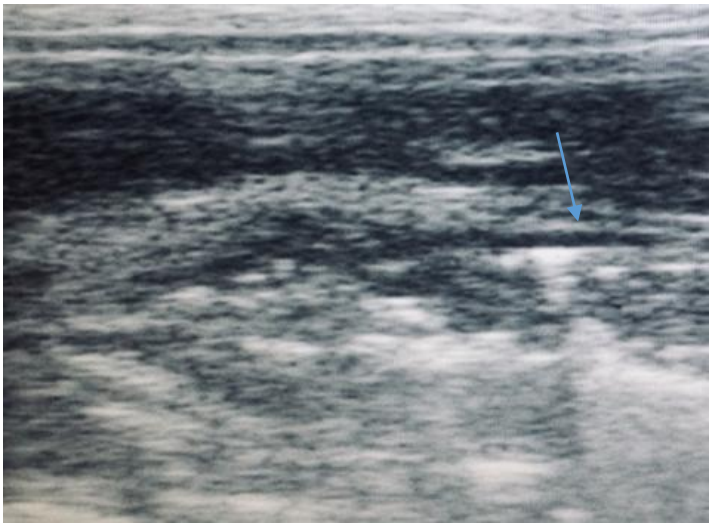


Рис.1. Экспериментальный ОДП. Ультразвуковое исследование поджелудочной железы. Контуры органа размыты, эхогенность усилена, неоднородная, панкреатический проток расширен (указано стрелкой).

Изучение результатов исследования крови у экспериментальных животных выявило схожие изменения, определенных у пациентов с ОДП. Определяли значительное увеличение уровня лейкоцитов в крови, альфа амилазы, щелочной фосфатазы и креатинина. Все показатели у экспериментальных животных имели значимые различия ($p<0,005$) с показателями в контроле (Табл).

Таблица

Результаты общего анализа крови (M± m)

Показатели	Контроль	Опыт	Единица измерения, СИ	Достоверность, p
Эритроциты	7,8±0,24	6,97±0,80	10x6/uL	-
Лейкоциты	14,8±0,26	14,2±2,84	10x3/uL	-
Гемоглобин	10,7±0,44	9,7±0,42	г/дл	-
Тромбоциты	423±22,4	242±30,0	10x3/uL	p<0,005
Гематокрит	34,8±2,58	39,7±4,36	%	p<0,05
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ)	1±0,90	38±4,6	Мм/ч	p<0,005
Нейтрофилы	32,9±2,90	69,4±3,58	%	p<0,005
Общий билирубин	1,5±0,38	4,2±0,22	Мкмоль/л	p<0,005
Альфа амилаза	246±4,4	2492±257,0	Е/л	p<0,005
Креатинин	76,6±0,86	332,2±32,52	Мкмоль/л	p<0,005
Общий белок	44,7±0,40	69,7±3,60	г/л	p<0,005
Щелочная фосфатаза	168,0±10,68	435,2±225,28	Е/л	p<0,005

При патологоанатомическом исследовании во всех случаях патологический процесс переходил в парапанкреатическую клетчатку, прежде всего за счет тесного прилегания к органу. На разрезе орган имел бледно-желтоватую окраску, подчеркнуто дольчатое строение, желтоватые, разной величины бляшковидной формы очаги некроза. В части случаев отмечалось геморрагическое пропитывание органа. Нередко выявлялись зоны нагноения, некроза. Парапанкреатическая клетчатка и жировая ткань, вовлеченная в гнойно-некротический процесс, была отечная, гиперемирована, с очагами гнойного расплавления. В апикально-каудальном направлении жировая клетчатка забрюшинного пространства менялась от резко выраженных гнойно-некротических изменений до малозаметных – инъецированной сосудистой сети, слабого уплотнения ткани за счет отека. При гистологическом исследовании обнаруживался выраженный отек ткани железы, стаз в микрососудах и тромботические массы в мелких венулах, кровоизлияния, очаги жирового некроза и обильная лейкоцитарная инфильтрация. В стенках утолщенных протоков определялся воспалительный процесс, когда клеточная инфильтрация была обусловлена лимфоцитами, лейкоцитами. В просвете протоков

обнаруживался слущенный эпителий. В ациноцитах дистрофические изменения представлялись вакуолями, терялись границы клеток, вплоть до их карио- и плазмолизиса. Вокруг очагов некроза обнаруживалось скопление нейтрофильных лейкоцитов. Очаги гнойного расплавления с формированием абсцессов выявлялись в самой поджелудочной железе и в парапанкреатической жировой клетчатке (Рис.2А).

При сравнении с обнаруженными изменениями при экспериментальном остром деструктивном панкреатите были выявлены схожие изменения в пораженных участках. При макроскопическом исследовании в полости малой сальниковой сумки аналогично больным с деструктивным панкреатитом, определяли скопление мутной жидкости, пятна жирового некроза. Поджелудочная железа имела очаги полнокровия, геморрагического пропитывания, жирового некроза. Исследование гистологических препаратов выявило массивные поля некроза ткани поджелудочной железы и нейтрофильной инфильтрации. В прилежащей жировой ткани обнаруживался выраженный отек, очаги некроза и скопления лейкоцитов, полнокровие сосудов, очаги кровоизлияний. В других внутренних органах опытных животных изменения носили реактивный характер и проявлялись дистрофическими изменениями, неравномерным кровенаполнением, что соответствовало аналогичным процессам у пациентов, умерших от осложнений панкреатита (Рис.2Б).

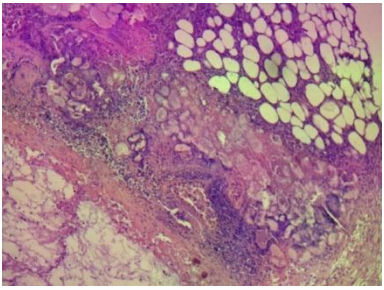
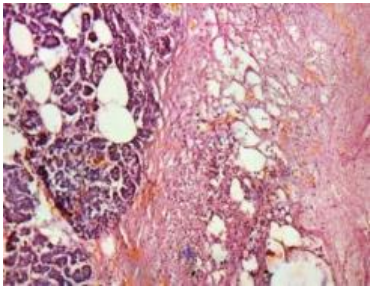
А  Б 

Рис.2. Микрофото. А - Третьи сутки эксперимента. Поджелудочная железа свиньи: в ткани органа определяются поля некроза и массивная нейтрофильная инфильтрация. Видны полнокровные сосуды, очаги кровоизлияний, межуточный отек. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100; Б - Пациент с острым деструктивным панкреатитом. Поджелудочная железа. Поля жирового некроза с массивной лейкоцитарной инфильтрацией вокруг некротического детрита и в строме. Сосуды расширены, полнокровные, определяются очаги геморрагического пропитывания. Окр. гематоксилином и эозином, ×100.

Иммуногистохимическое исследование выявило выраженную экспрессию Caspasa-3 в панкреатоцитах, Ki-67 в ядрах ациноцитов и эпителия протоков (Рис.3), bcl-2 эпителии протоков и эпителии эндотелиоцитов кровеносных сосудов.

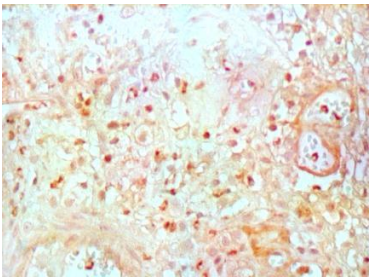
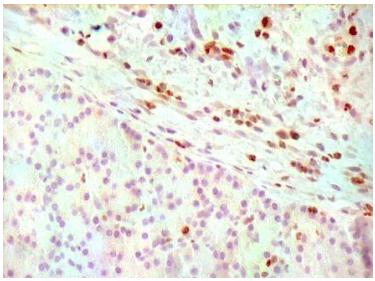
А  Б 

Рис.3. Поджелудочная железа, микрофото: А – пациент с острым деструктивным панкреатитом – выраженная экспрессия маркера Ki-67 в ациноцитах и адипоцитах поджелудочной железы; Б – выраженная экспрессия маркера Ki-67 в ткани поджелудочной железы у животного (свинья) в эксперименте. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Ki-67, ув.400.

Таким образом, полученные результаты и тщательное изучение результатов клинического и морфологического исследования свидетельствуют о развитии у экспериментальных животных деструктивного панкреатита, сопоставимого у пациентов с тяжелой формой этого заболевания.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Александрова А. К., Мотина М. П., Чунчиев И. Д. Диагностика и оценка эффективности лечения острого панкреатита // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2017. Т. 2. – С. 371–375. – URL: http://e-koncept.ru/2017/570074.htm.
2. Имаева А.К., Мустафин Т.И. Особенности патологоанатомического вскрытия при остром деструктивном панкреатите// Морфологические ведомости.- 2020. Т. 28.- № 2.- С. 48-54. https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(2: 48-54.

3. Ушкевич А.Л., Жандаров К.Н., Прокопчик Н.И.. Моделирование острого деструктивного панкреатита в эксперименте. Новости хирургии. – 2010. Т.18, №2. – С.8-14.
4. Matsuda Y, Masuda Y, Shimoji K, Matsukawa M, Kinowaki Y, Fukumura Y, Kikuyama M, Arai T. Severe Acute Pancreatitis in Autopsies Associated With Surgeries and Severe Inflammatory Diseases // Pancreas. 2019. Vol. 48. No.10. Pp. 1321-1328.

© Имаева А.К., Батыршина Э.Р., Фазлыахметова М.Я., 2022

УДК: 612.826.4
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.15

ИНСУЛИН КАК МОДУЛЯТОР СПАЙКОВОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ЦИРКАДИАННОГО ОСЦИЛЛЯТОРА СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА

© Инюшкин А.Н.[1]*, Мистрюгов К.А.[2], Романова И.Д.[1], Исакова Т.С.[1], Инюшкина Е.М.[1]
[1] Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П.Королева, г. Самара
[2] Самарский государственный медицинский университет, г. Самара
* ainyushkin@mail.ru

Аннотация. В экспериментах in vitro на переживающих срезах гипоталамуса крыс изучали влияние аппликаций 15 нМ инсулина на показатели спайковой активности и спайкового кодирования информации нейронами циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра. Треть протестированных нейронов отреагировали на воздействие инсулина снижением уровня активности, сопровождавшимся ростом степени нерегулярности генерации спайков. Реакции противоположной направленности наблюдались в 12% случаев. В то же время не было обнаружено изменений паттернирования спайковой информации под действием инсулина. Полученные результаты в совокупности с данными литературы об экспрессии инсулиновых рецепторов в супрахиазматическом ядре свидетельствуют о том, что гормон инсулин может участвовать в механизме нефотической настройки циркадианных биологических часов.

Ключевые слова: супрахиазматическое ядро; циркадианные ритмы; инсулин; спайковая активность.

INSULIN AS A MODULATOR OF SPIKE ACTIVITY OF THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS CIRCADIAN OSCILLATOR NEURONES

Inyushkin A.N.[1]*, Mistryugov K.A.[2], Romanova I.D.[1], Isakova T.S.[1], Inyushkina E.M.[1]
[1] Samara National Research University, Samara, Russia
[2] Samara State Medical University, Samara, Russia
* ainyushkin@mail.ru

Abstract. In the in vitro experiments on the rat hypothalamic slices, the effects of 15 nM insulin on spike activity and spike information coding by neurones of the suprachiasmatic nucleus circadian oscillator were

studied. One-third of the neurones tested responded to insulin application by a decrease in the activity level, accompanied by an increase in the degree of spike generation irregularity. Responses of the opposite direction were observed in 12% of cases. No changes in the patterning of spike information in the presence of insulin were found. The results, together with the data of literature about the expression of insulin receptors in the suprachiasmatic nucleus, indicate that the hormone insulin may be involved in the mechanism of non-photic entrainment of the circadian biological clock.

Keywords: suprachiasmatic nucleus; circadian rhythms; insulin; spike activity.

Введение

Способность генерировать собственные циркадианные (околосуточные) физиологические, биохимические и поведенческие ритмы является неотъемлемым свойством организма млекопитающих, способствующим синхронизации его функционирования с ежедневно повторяющимися событиями во внешней среде. Циркадианные ритмы млекопитающих генерируются в главном осцилляторе, расположенном в супрахиазматическом ядре гипоталамуса [1–3]. Ведущая роль нейронов супрахиазматического ядра в генерации и контроле циркадианных ритмов доказана в экспериментах с его локальным разрушением и последующей заместительной трансплантацией эмбриональной ткани. Разрушение супрахиазматического ядра вызывало поведенческую и физиологическую аритмию [4], а последующая трансплантация его ткани – к восстановлению циркадианных ритмов, характерных для доноров [5]. Нейроны супрахиазматического ядра обладают способностью генерировать циркадианный ритм спайковой активности даже в условиях изоляции in vitro [6, 7], сохраняя чувствительность к гормонам и нейропептидам [8–11].

Хотя основной механизм точной настройки осциллятора супрахиазматического ядра на 24-часовой период базируется на информации, поступающей от фоточувствительных ганглиозных клеток сетчатки [12], он не является единственным. Важный нефотический механизм настройки связан с режимом питания и характером пищи [13]. В рамках этого механизма супрахиазматическое ядро, задающее драйв к приему пищи, взаимодействует с сетью других гипоталамических ядер – вентромедиальным, дорсомедиальным, паравентрикулярным, аркуатным и перифорникальным [14]. Потенциальным модулятором нефотической настройки циркадианного осциллятора, связанной с пищей, является гормон инсулин. В

литературе имеются отдельные свидетельства способности инсулина модулировать уровень электрической активности нейронов супрахиазматического ядра [15]. Кроме этого, в супрахиазматическом ядре обнаружен высокий уровень экспрессии инсулиновых рецепторов [16]. Все это предполагает непосредственное влияние инсулина на механизмы генерации циркадианного ритма на уровне супрахиазматического ядра. Такое предположение подтверждено результатами нашего исследования in vivo, в котором была продемонстрирована способность инсулина вызывать опережающий фазовый сдвиг поведенческого ритма произвольной локомоторной активности при интраназальном введении в специфические моменты циркадианного цикла [17].

В ходе настоящей работы на крысах изучено влияние инсулина на уровень спайковой активности и параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра in vitro.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар массой тела 70 – 160 г. Экспериментальный протокол был согласован с комиссией по биологической этике Самарского государственного университета. Крыс анестезировали (1.2 г уретана на кг массы тела внутрибрюшинно) и декапитировали. Головной мозг охлаждали в искусственной цереброспинальной жидкости при температуре 1–3 °С, с помощью вибратома (Vibroslice NVSL, WPI, США) готовили сагиттальные срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм. Срезы, по меньшей мере, в течение часа инкубировали в насыщенной кислородом искусственной цереброспинальной жидкости (124 мМ NaCl, 25 мМ $NaHCO_3$, 3 мМ KCl, 1,5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgSO_4$, 0,5 мМ NaH_2PO_4, 30 мМ глюкозы) при температуре 37 °С вплоть до начала регистрации. Для регистрации срезы помещали в камеру из органического стекла и перфузировали с постоянной скоростью 1,5 мл/мин. с помощью перистальтической помпы (Minipuls 3, Gilson, Франция). Регистрацию производили при температуре 27–30 °С. Спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра регистрировали внеклеточно, с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика около 1 мкм, заполненных искусственной цереброспинальной жидкостью для перфузии среза. Сигнал от микроэлектрода усиливали (2400 A, Dagan, США), устраняли шум частотой 50 Гц (Hum Bug; Quest Scientific, Канада), отцифровывали (Micro 1401, CED, Великобритания) и подавали на персональный компьютер. Первичную обработку и

хранение данных осуществляли с помощью программного пакета Spike 2 (CED, Великобритания). После появления спайковой активности наблюдали за ней в исходном состоянии не менее 10 минут, чтобы убедиться в стабильности частоты генерации потенциалов действия. При отсутствии заметной тенденции к нарушению постоянства этого показателя перфузию меняли на раствор того же состава с добавлением 15 нМ инсулина на 10 минут, а затем возвращались к исходному раствору для «отмывания» среза от инсулина. С целью исключения возможной десенситизации, на каждый срез производили однократную аппликацию инсулина. Продолжительность «отмывания» составляла 15 минут.

Первым этапом обработки данных было тщательное выделение всех зарегистрированных спайков из шума и артефактов. Далее, наряду с расчётом «традиционного» параметра электрической активности нейронов – средней частоты генерации спайков, вычисляли параметры, характеризующие спайковое кодирование информации: энтропию распределения межспайковых интервалов, являющуюся мерой их неоднородности, и обоюдную информацию между сопряжёнными межспайковыми интервалами, отражающую паттернирование спайковой информации [8, 9, 18]. Методика расчета показателей спайкового кодирования информации была подробно описана ранее [11].

Для выяснения эффектов инсулина сравнивали значение параметров спайковой активности в течение двух пятиминутных интервалов времени: в исходном состоянии (непосредственно перед аппликацией), и в конце периода аппликации. Нейронами, реагирующими на воздействие инсулина, считались лишь те, у которых частота генерации спайков изменялась под влиянием этого вещества не менее, чем на 20% от исходной [19]. После этого анализировали исследуемые параметры в течение заключительного пятиминутного периода «отмывания» среза и делали заключение о степени восстановления исходной активности нейронов.

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для сравнения значений исследуемых показателей в ходе экспериментальных воздействий с исходным состоянием использовали парный *t*-тест или ранговый тест Уилкоксона (в случае несоответствия распределения данных в выборках нормальному). Нормальность распределения данных в выборках проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка, однородность дисперсий – с помощью теста Левена. Данные, соответствующие нормальному распределению, представлены как средние арифметические ± стандартные ошибки среднего.

Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при P<0,05.

Результаты и обсуждение

Всего изучены реакции параметров спайковой активности 75 нейронов супрахиазматического ядра на воздействие инсулина. Для этих нейронов в исходном состоянии частота генерации потенциалов действия составила 2,55 ± 0,26 $с^{-1}$, энтропия распределения межспайковых интервалов для этих нейронов равнялась 6,59 ± 0,10 бит, а обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами составила 0,060 ± 0,013 бит. Воздействие 15 нМ инсулина вызвало изменение частоты генерации потенциалов действия у 34 из 75 (45,3%) протестированных нейронов; остальные нейроны (41 из 75; 54,7%) не изменяли уровень спайковой активности.

У 25 из 75 нейронов (33,3%) реакции на воздействие инсулина характеризовались снижением частоты генерации спайков. Пример реакции на аппликацию инсулина в виде снижения уровня спайковой активности у нейрона супрахиазматического ядра показан на рис. 1. Медиана частоты спайков у нейронов данной группы снизилась с 1,34 $с^{-1}$ в исходном состоянии до 0,43 $с^{-1}$ в присутствии инсулина (P<0,001). Характерной особенностью реакций этих клеток на аппликацию инсулина был рост энтропии распределения межспайковых интервалов с 6,73 ± 0,19 бит до 7,26 ± 0,21 бит (P<0,01), что свидетельствует о повышении степени нерегулярности генерации спайков. Статистически значимых изменений обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами обнаружено не было, несмотря на умеренную тенденцию к увеличению данного показателя, значение которого составило 0,086 ± 0,031 бит в исходном состоянии и 0,111 ± 0,045 бит в присутствии инсулина (P=0,407).

Рис. 1. Реакция спайковой активности нейрона супрахиазматического ядра на воздействие 15 нМ инсулина in vitro. Представлены 100-секундные фрагменты записи в исходном состоянии и в присутствии инсулина. У данного нейрона под действием инсулина произошло снижение частоты генерации спайков с 0,95 до 0,34 $с^{-1}$ и

повышение энтропии распределения межспайковых интервалов с 6,94 до 7,44 бит. Обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами также возросла под влиянием инсулина с 0 до 0,095 бит.

Реакции нейронов супрахиазматического ядра противоположной направленности (в виде повышения уровня биоэлектрической активности) на воздействие 15 нМ инсулина зарегистрированы в 9 случаях из 75 (12,0%). Статистическое сравнение показало, что такие реакции на аппликации инсулина встречались реже, чем реакции в виде снижения активности ($P<0,01$). Рост уровня активности клеток выражался в повышении медианы частоты генерации потенциалов действия с 0,47 до 0,89 $с^{-1}$ ($P<0,01$). Одновременно с повышением уровня спайковой активности у данной группы нейронов при воздействии инсулина наблюдалось небольшое, но статистически значимое снижение медианы энтропии распределения межспайковых интервалов с 6,85 до 6,65 бит ($P<0,05$: ранговый тест Уилкоксона). Изменений обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами обнаружено не было ($P=1.00$), а значение медианы данного показателя и в исходном состоянии, и в период действия инсулина оказалось равным нулю.

При статистическом анализе реакций на воздействие инсулина всех 75 протестированных нейронов как единой группы были обнаружены изменения показателей спайковой активности клеток супрахиазматического ядра. Медиана частоты генерации спайков снизилась с 1,56 до 1,37 $с^{-1}$ ($P<0,001$). Одновременно с этим наблюдалось увеличение степени нерегулярности генерации спайков, что выражалось в небольшом, но статистически значимом росте медианы энтропии распределения межспайковых интервалов с 6,67 до 6,79 бит ($P<0,05$). В то же время обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами не изменялась ($P=0,436$). Медиана этого показателя равнялась нулю и в исходном состоянии, и после аппликации инсулина, что отражает отсутствие существенного паттернирования информации в спайковом коде в данных экспериментальных условиях.

Реакции нейронов супрахиазматического ядра на воздействие инсулина характеризовались полной или частичной обратимостью: к концу периода «отмывания» среза отчётливо прослеживалась тенденция к восстановлению исходной величины всех исследуемых параметров спайковой активности.

Таким образом, в ходе настоящей работы воздействие инсулина привело к изменениям параметров спайковой активности у значительной части исследованных нейронов супрахиазматического ядра. В 1/3 наблюдений аппликация инуслина вызвала снижение частоты генерации потенциалов действия; одновременно с этим наблюдался рост энтропии распределения межспайковых интервалов, что свидетельствует о повышении степени нерегулярности генерации спайков под влиянием данного вещества. В то же время изменений обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами в условиях действия инсулина обнаружено не было; по всей видимости, в данных экспериментальных условиях инсулин не оказывал существенного влияния на спайковый паттернинг. Примерно в 3 раза реже (в 12% наблюдений) встречались реакции на инсулин в виде роста уровня активности с одновременным снижением энтропии распределения межспайковых интервалов. При этом существенных признаков спайкового паттернирования информации этими нейронами не обнаруживалось ни в исходном состоянии, ни в условиях воздействия инсулина. Таким образом, в ходе изучения реакций спайковой активности на воздействие инсулина была обнаружена обратная зависимость между изменениями средней частоты генерации потенциалов и энтропией распределения межспайковых интервалов. По всей вероятности, данная зависимость не связана со специфическими свойствами инсулина, но скорее является следствием фундаментальных электрофизиологических свойств самого циркадианного осциллятора. Действительно, обратная зависимость между средней частотой генерации потенциалов действия и величиной энтропии распределения межспайковых интервалов у нейронов супрахиазматического ядра ранее была обнаружена в экспериментах in vivo и in vitro, в которых введения экзогенного инсулина не производилось [7]. При этом изменения величины энтропии отражают сдвиги баланса между стохастическими факторами (такими как параметры синаптических входов, как правило соответствующие нормальному распределению) и детерминистическими факторами (такими как форма и продолжительность следовых потенциалов) регуляции межспайковых интервалов [18].

Следует заметить, что в современной литературе практически не встречается работ, посвящённых исследованию влияния инсулина на параметры спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра. К настоящему времени выполнено единственное подобное исследование на фронтальных срезах гипоталамуса крыс [15], в котором было обнаружено преимущественно угнетающее влияние

аппликаций инсулина на уровень биоэлектрической активности нейронов супрахиазматического ядра. При этом эффекты инсулина исследовались в условиях блокады синаптической передачи (срезы перфузировали раствором Кребса, в котором отсутствовали ионы Ca^{2+}), что подтвердило существование прямого влияния инсулина на активность регистрируемых нейронов. Вместе с тем, авторы ограничились регистрацией средней частоты генерации потенциалов действия; влияние инсулина на параметры спайкового кода осталось неизученным. Таким образом, способность инсулина воздействовать на степень регулярности генерации потенциалов действия нейронами супрахиазматического ядра впервые обнаружена в ходе настоящей работы. Ранее в экспериментах на крысах in vivo был продемонстрирован суточный ритм энтропии распределения межспайковых интервалов у нейронов супрахиазматического ядра [7]. Сведения о способности инсулина оказывать влияние на величину данного показателя спайкового кодирования информации позволяют предполагать возможность непосредственного участия данного вещества в регуляции суточного ритма энтропии наряду с мелатонином [8] и лептином [9], в основе которого лежит локальная активность инсулина на уровне циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра.

Важным аргументом в пользу прямого действия инсулина на циркадианный осциллятор являются данные литературы о том, что супрахиазматическое ядро гипоталамуса содержит инсулиновые рецепторы, при этом установлено, что тирозин киназа β-субъединицы этих рецепторов может одновременно активироваться мелатонином через MT_1/MT_2 рецепторы; это указывает на возможность взаимодействия мелатонина и инсулина на уровне данного ядра [16]. Не исключено, однако, что в определённой степени обнаруженные эффекты могут быть опосредованы другим типом рецепторов, также обнаруженных в данной области мозга и обладающих сродством к инсулину – IGF-1 рецепторами [20, 21], хотя аффинитет последних к инсулину приблизительно в 340 раз ниже, чем у инсулиновых рецепторов [22]. Полученные результаты в совокупности с данными литературы об экспрессии инсулиновых рецепторов в супрахиазматическом ядре свидетельствуют о том, что гормон инсулин может участвовать в механизме нефотической настройки циркадианных биологических часов.

Работа выполнена при поддержке средств финансирования Программы развития Самарского университета на 2021–2030 годы в рамках программы «Приоритет-2030».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Арушанян Э.Б., Попов А.В. Современные представления о роли супрахиазматических ядер гипоталамуса в организации суточного периодизма физиологических функций // Успехи физиологических наук. 2011. Т. 42. №4. С. 39–58.
2. Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М. Влияние изменений состояния нейромедиаторных и пептидергической систем мозга на циркадианные ритмы и поведение крыс // Журнал ВНД им. И.П.Павлова. 2012. Т. 62. №4. С. 1–12.
3. Hastings M.H., Brancaccio M., Maywood E.S. Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus // Journal of Neuroendocrinology. 2014. Vol. 26 P. 2–10.
4. Ralph M.R., Foster R.G., Davis F.C., Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period // Science. 1990. Vol. 247(4945). P. 975–978.
5. Sollars P.J., Pickard G.E. Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic grafts containing the suprachiasmatic nucleus: graft/host interconnections // Chronobiology International. 1998. Vol. 15. P. 513–533.
6. Meijer J.H., Shaap J., Watanabe K., Albus H. Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: in vivo versus in vitro models // Brain Research. 1997. Vol. 753. P. 322–327.
7. Bhumbra G.S., Inyushkin A.N., Saeb-Parsy K., Hon A., Dyball R.E.J. Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus // Journal of Physiology. 2005. Vol. 563. No 1. P. 291–307.
8. Inyushkin A.N., Bhumbra G.S., Gonzalez J.A., Dyball R.E.J. Melatonin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus // Journal of Neuroendocrinology. 2007. Vol. 19. P. 671–681.
9. Inyushkin A.N., Bhumbra G.S., Dyball R.E.J. Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus // Journal of Neuroendocrinology. 2009. Vol. 21. P. 705–714.
10. Klisch C., Inyushkin A.N., Mordel J., Karnas D., Pevet P., Meissl H. // Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. European Journal of Neuroscience. 2009. Vol. 30. P. 65–75.
11. Инюшкин А.Н., Петрова А.А., Ткачева М.А., Инюшкина Е.М. Влияние нейропептида Y на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра крыс in vitro // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2015. Т. 101. №11. С. 1257–1269.

12. Ashton A., Foster R.G., Jagannath A. Photic entrainment of the circadian system // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23. No 2. 729.
13. Mistlberger R.E., Antle M.C. Entrainment of circadian clocks in mammals by arousal and food // Essays in Biochemistry. 2011. Vol. 49. No 1. P. 119–136.
14. Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D.Jr., Seeley R.J., Baskin D.G. Central nervous system control of food intake // Nature. 2000. Vol. 404. P. 661–671.
15. Shibata S. Liou S.Y., Ueki S., Oomura Y. Inhibitory action of insulin on suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slice preparations // Physiology and Behavior. 1985. Vol. 36. No 1. P. 79–81.
16. Anhe G.F., Caperuto L.C., Pereira-Da-Silva M., Souza L.C., Hirata A.E., Velloso L.A., Cipolla-Neto J., Carvalho C.R.O. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus // Journal of Neurochemistry. 2004. Vol. 90. P. 559–566.
17. Инюшкин А.Н., Мистрюгов К.А., Громова Д.С., Пугачёв Е.И., Беляков В.И., Инюшкина Е.М. Влияние инсулина на циркадианный ритм произвольной локомоторной активности крыс // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2011. Т. 97. №7. С. 678–689.
18. Bhumbra G.S., Inyushkin A.N., Dyball R.E.D. Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus // Journal of Neuroendocrinology. 2004. Vol. 16. P. 390–397.
19. Brown T.M., Coogan A.N., Cutler D.J., Hughes A.T., Piggins H.D. Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons in vitro // Neuroscience Letters. 2008. Vol. 448. P. 273–278.
20. Michels K.M., Saavedra J.M. Differential development of insulin-like growth factor I binding in the suprachiasmatic nucleus and median eminence of the rat hypothalamus // Neuroendocrinology. 1991. Vol. 54. P. 504–514.
21. Wada A., Yokoo H., Yanagita T., Kobayashi H. New twist on neuronal insulin receptor signalling in health, disease and therapeutics // Journal of Pharmacological Sciences. 2005. Vol. 99. P. 128–143.
22. Zhang W., Gustafson T.A., Rutter W.J., Johnson J.D. Positively charged side chains in the insulin-like growth factor 1 C- and D-regions determine receptor binding specificity // Journal of Biological Chemistry. 1994. Vol. 269. P. 10609-10613.

© Инюшкин А.Н., Мистрюгов К.А., Романова И.Д.,
Исакова Т.С., Инюшкина Е.М., 2022

УДК: 612.084
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.16

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОСОНТЕРАПИИ НА КУРЯЩИХ И НЕКУРЯЩИХ МОЛОДЫХ ЛЮДЕЙ

© Инюшкина Е.М.*, Лазаренко Ю.Г., Коломеец Д.С., Тулина Н.А., Инюшкин А.Н.
Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, Россия
*inyushkina@mail.ru

Аннотация. Табачный дым содержит психоактивное вещество никотин, который вызывает слабую эйфорию, воздействуя на нервную систему. Привычка курить получила распространение у молодых людей с еще не устоявшейся психикой. У курильщиков развивается зависимость от никотина. Попытка избавиться от этой привычки часто приводит к увеличению тревожности, раздражительности и депрессии. Методика электросонтерапии имеет в своей основе как антистрессорное, седативное, так и стимулирующее, повышающее общий жизненный тонус действие. В настоящее время в литературе отсутствуют данные о влиянии электросонтерапии на людей с табачной зависимостью и без нее. Мы предполагаем, что прибор Электросон может оказывать непосредственное влияние на курящих и некурящих людей. Целью исследования явилось изучение влияния электросонтерапии на курящих и некурящих молодых людей. В результате проведенных исследований нами были получены новые данные о влиянии электросонтерапии на молодых людей с никотиновой зависимостью и без нее. Было выявлено, что у некурящих молодых людей индекс Баевского, показывающий степень напряженности нервной системы и степень централизации при управлении сердечным ритмом, статистически значимо снижается. У некурящих молодых людей частота сердечных сокращений также значимо снижается. После сеанса электросонтерапии у курящих молодых людей показатель энтропии имел тенденцию к повышению. Энтропия логарифма интервала R-R у некурящих молодых людей статистически значимо повышается. Полученные результаты могут свидетельствовать о седативном действии сеанса электросонтерапии как на курящих, так и на некурящих молодых людей. Результаты проведенного исследования

дополняют и расширяют представления о методике электросонтерапии.

Ключевые слова: электросонтерапия, пульсоксиметрия, табакокурение, курящие и некурящие молодые люди.

EFFECT OF ELECTROCONTHERAPY ON SMOKING AND NON-SMOKING YOUNG PEOPLE

Inyushkina E.M.*, Lazarenko Yu.G., Kolomeets D.S., Tulina N.A., Inyushkin A.N.
Samara University, Samara
*inyushkina@mail.ru

Abstract. Tobacco smoke contains the psychoactive substance nicotine, which causes mild euphoria, affecting the nervous system. The habit of smoking has become widespread among young people with not yet established mentality. Smokers develop dependence on nicotine. Trying to get rid of this habit often leads to increased anxiety, irritability and depression. The electrocontherapy technique is based on both antistress, sedative, and stimulating, increasing the overall vitality effect. Currently, there is no data in the literature on the effect of electrosontherapy on people with and without tobacco addiction. We assume that the Electroson device can have a direct impact on smokers and non-smokers. The aim of the study was to study the effect of electrocontherapy on smoking and non-smoking young people. As a result of our research, we have obtained new data on the effect of electrosontherapy on young people with and without nicotine addiction. It was found that in non-smoking young people, the Bayevsky index, which shows the degree of tension of the nervous system and the degree of centralization in the management of heart rhythm, statistically significantly decreases. In non-smoking young people, the heart rate also significantly decreases. After an electrosontherapy session, the Entp index tended to increase in young people who smoked. The entropy of the logarithm of the R-R interval increases statistically significantly in non-smoking young people. The results obtained may indicate the sedative effect of the electrocontherapy session on both smokers and non-smokers of young people. The results of the study complement and expand the understanding of the method of electrosontherapy.

Keywords: electrosontherapy, pulse oximetry, tobacco smoking, smoking and non-smoking young people

Введение

В настоящее время табакокурение достаточно распространено среди молодежи [1]. Табачный дым содержит психоактивное вещество — никотин, которое вызывает слабую эйфорию, воздействуя на нервную систему человека. У курильщиков развивается зависимость от никотина [2]. Избавиться от этой привычки многим достаточно трудно, т.к. есть вероятность развития "синдрома отмены", из-за которого развивается тяга к курению, тревожность, раздражительность, увеличение веса (из-за попытки "заесть" стресс), а также депрессия. При использовании в физиотерапии прибора Электросон было выявлено, что под влиянием прямоугольного импульсного тока в мозге человека происходит стимуляция выработки серотонина и эндорфинов, т.е. снижение эмоциональной активности, а также осуществляется седативное и болеутоляющее действие [3;4]. Однако на сегодняшний момент в литературе отсутствуют данные о влиянии электросонтерапии на людей с табачной зависимостью и без нее. Исходя из вышесказанного, мы можем предположить, что сеансы электросонтерапии могут оказывать непосредственное влияние на курящих и некурящих молодых людей.

Целью нашей работы явилось исследование влияния электросонтерапии на курящих и некурящих молодых людей

Материалы и методы

Эксперимент проводился на 20 студентах мужского пола Самарского университета, возрастом 20-21 год, которые были разделены на две равные группы: курящие и некурящие молодые люди. Испытуемые подвергаются сеансу электросна один раз в день, продолжительностью 60 минут.

Процедура электросонтерапии проходила в спокойной обстановке, способствующей наступлению сна: в темной комнате, в условиях тишины, комфортной температуре, хорошо проветриваемом помещении. Испытуемый садились на кушетку, на его голову одевались электроды. Они представлены в виде металлических чашек, вмонтированных в резиновую манжетку. Их заполняли ватными тампонами, смоченными в физрастворе, накладывали на сомкнутые веки глаз, присоединяли к отрицательному полюсу аппарата для электросна. Два других электрода, после заполнения влажными ватными тампонами, накладывали на область сосцевидных отростков височных костей. Далее оказывалась помощь в принятии испытуемым комфортной позы на кушетке. Затем устанавливали подходящую

частоту тока, медленно увеличивая его силу до ощущения легких покалываний и вибрации.

До и после электросонтерапии у испытуемых при помощи пульсоксиметра «ЭЛОКС-01М» [5] анализировали следующие показатели:

1). ИБ (индекс Баевского), усл. ед. – индекс напряжения по Р. М. Баевскому, вычисляемый по формуле:

$$ИБ = \frac{AMo}{2Mo} \times DX;$$

где ИБ – индекс напряжения; Мо (мода) – наиболее часто встречающееся значение кардиоинтервала, с.; АМо (амплитуда моды) – частота встречаемости; DX (вариационный размах) – разница между максимальными и минимальными значениями длительности интервалов R-R.

2). СИМ (активность симпатического отдела), усл. ед. – значение индекса ВСР (вариабельность сердечного ритма), вычисляемое по формуле:

$$СИМ = 4 \times \frac{AMo}{N_{20\%}};$$

где $N_{20\%}$ - чисто интервалов группирования гистограммы, содержащее количество NN-интервалов, превышающих уровень 20% от значения АМо; СИМ – уровень активности симпатического отдела вегетативной нервной системы.

3). ПАР (активность парасимпатического отдела), усл. ед. – значение индекса ВСР (вариабельность сердечного ритма), которая является индексом активности парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. Характеризуется степенью отклонения распределения NN-интервалов от нормального закона распределения. Чем больше отклонений от нормального распределения, характеризующегося плавным убыванием количества NN-интервалов влево и вправо относительно моды, тем больше значение ПАР.

Взаимодействие и определенное соотношение значений СИМ и ПАР позволяют оценить реакцию вегетативной нервной системы на воздействующие внешние и внутренние факторы.

4). HF (high frequency или ВЧ - высокочастотные колебания), $мс^2$ – спектральная мощность колебаний ритма сердца в диапазоне высоких частот (0,15 – 0,4 Гц). Мощность в этом диапазоне, в основном, связана с дыхательными движениями и отражает вагусный контроль сердечного ритма (колебания парасимпатического отдела вегетативной нервной системы).

5). LF (low frequency или НЧ - низкочастотные колебания), $мс^2$ – спектральная мощность колебаний ритма сердца в диапазоне низких

частот (0,04 – 0,15 Гц). Она имеет смешанное происхождение. На мощность в этом диапазоне оказывают влияние изменения тонуса как симпатического (преимущественно), так и парасимпатического отдела вегетативной нервной системы.

6). HR (heat rate или ЧСС - частота сердечных сокращений), уд/мин – частота сердечных сокращений, вычисленная по среднему значению NN-интервалов в анализируемой выборке. Повышение симпатической активности вызывает увеличение ЧСС, повышение парасимпатической активности действует противоположным образом. Ритм сердца является реакцией организма на различные раздражения внешней и внутренней среды. ЧСС определяется многочисленными регуляторными механизмами.

7). Энтропия – мера неопределенности (неоднородности), информационная емкость, которую мы рассчитывали по формуле Клода Шеннона:

$$S(X) = -\sum_{i=1}^{N_x} P(x_i) log_2 P(x_i)$$

С помощью вероятностной функции энтропии можно анализировать стадии перехода системы от состояния полного хаоса, которому соответствуют максимальное значение энтропии, к состоянию предельно возможной упорядоченности.

Статистическую и графическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot. Статистическая значимость указывалась, если P <0,05.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований нами были получены следующие данные. После сеанса электросонтерапии у курящих молодых людей не наблюдалось статистически значимых изменений индекса Баевского ($p \geq 0,05$), однако имелась тенденция к повышению.

У некурящих молодых людей индекс Баевского, показывающий степень напряженности нервной системы и степень централизации при управлении сердечным ритмом, статистически значимо ($p<0,05$) снижается (при использовании теста Shapiro-Wilks) на 30%. Это факт может свидетельствовать о седативном и антидепрессивном действии сеанса электросонтерапии на человека.

После сеанса электросонтерапии у курящих и некурящих молодых людей не наблюдалось статистически значимых изменений активности симпатического и парасимпатических отделов ($p \geq 0,05$), однако имелись тенденции как к повышению, так и к снижению. Также

после сеанса электросонтерапии у курящих и некурящих молодых людей не наблюдалось статистически значимых изменений показателя HF ($p \geq 0,05$), однако имелась тенденция к понижению.

Также нами было выявлено, что после сеанса электросонтерапии у курящих и некурящих людей не наблюдалось статистически значимых изменений показателя LF ($p \geq 0,05$), однако имелась тенденция к повышению.

Как известно, показатели HF и LF отражают уровень активности симпатических и парасимпатических отделов вегетативной нервной системы. В большинстве случаев показатели HF и LF имели тенденцию к повышению, кроме показателя HF курящих молодых людей, который имеет тенденцию к понижению. Из этого можем сделать предположение, что электросонтерапия может оказывать разноплановое воздействие на эти показатели у человека.

После сеанса электросонтерапии у курящих молодых людей не наблюдалось статистически значимых изменений показателя HR ($p \geq 0,05$), однако имелась тенденция к снижению.

У некурящих молодых людей показатель HR статистически значимо ($p=0,034$) снижается (при использовании теста Shapiro-Wilks) на 14%. Эти факты могут говорить о некотором седативном действии электросонтерапии.

После сеанса электросонтерапии у курящих молодых людей не наблюдалось статистически значимых изменений показателя Entp ($p \geq 0,05$), однако имелась тенденция к повышению. Энтропия логарифма интервала R-R у некурящих молодых людей статистически значимо ($p=0,012$) повышается (при использовании теста Mann-Whitney Rank Sum) на 9%.

Использованный в нашей работе подход к анализу R-R интервалов, в соответствии с которым кроме частоты генерации потенциалов действия учитывались показатели интервалов, оказался полезным в плане количественной оценки пейсмекерной активности сердца, а также идентификации типа активности клеток [6]. У некурящих молодых людей энтропия повышается, т.е. растет разнообразие интервалов R-R, следовательно, растет их неоднородность.

Исходя из наших исследований, мы можем предположить, что электросонтерапия оказывает седативный эффект на некоторые показатели сердечно-сосудистой системы. Полученные в нашем исследовании результаты могут быть использованы в дальнейшем в медицине, в физиотерапии, а также при лечении зависимостей разного рода и депрессивных состояний.

Литература

1. Дзюбайло А.В. Роль активного и пассивного курения в формировании показателей здоровья общества: учеб. пособие / Сост. А.В. Дзюбайло. Самара: Издательство «Самарский университет», 2015.
2. Ногеров А.Р. К проблеме современного общества – табакокурения // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2013. Том 3. №7. С. 1019-1021.
3. Герцев А.В. Особенности влияния импульсной электротерапии (электросонтерапии) на нейропептидноцитокиновый профиль при артериальной гипертензии, протекающей на фоне астеноневротических нарушений, у мужчин молодого возраста из группы напряженных профессий // Медицинская иммунология. 2018. Том 20. №1. С. 123-128
4. Жидкова Е.А. Применение процедуры электросна для повышения скорости и эффективности гипнотерапии в реабилитации хирургических и травматологических пациентов // Личность в меняющемся мире: здоровье, адаптация, развитие. 2015. №2. С. 300-302.
5. Каков. С.В., Мулер В.П. Пульсоксиметрия // Вестник новых медицинских технологий. 2006. Т. 13. №1. С. 171-172.
6. Инюшкин А.Н., Петрова А.А., Ткачева М.А., Инюшкина Е.М. Влияние нейропептида Y на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра крыс in vitro // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2015. Т. 101. № 11. С. 1257-1269.

© Инюшкина Е.М., Лазаренко Ю.Г., Коломеец Д.С., Тулина Н.А., Инюшкин А.Н., 2022

УДК: 591.3:591.481:597.5
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.17

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИЯ MAP 2, ВИМЕНТИНА И НЕСТИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ И ПОВТОРНОЙ ОСТРОЙ ТРАВМЕ МЕЗЕНЦЕФАЛОНА МОЛОДИ КЕТЫ ONCORHYNCHUS KETA

©Капустянов И.А*, Пущина Е.В., Вараксин А.А.
Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского, г. Владивосток, Россия
*ilyaak9772@gmail.com

Аннотация. Нами исследовались области ствола мозга и в мозжечке годовалых особей Тихоокеанской кеты Oncorhynchus keta через 75 дней после нанесения первичной хронической травмы и через 7 дней после нанесения повторной острой травмы в область мезенцефалического тегментума. Методом ИГХ маркирования нестина, виментина и микротубулин ассоциированного белка (MAP 2), а также с использованием экспериментального ИГХ маркирования бромдезоксиуредина были исследованы процессы пролиферации, клеточной дифференциации и клеточной миграции. В областях ствола мозга и мозжечка были выявлены волокна радиальной глии, вдоль которых идет клеточная миграция клеток предшественников. Также в данных областях мы наблюдали гранулосодержащие клеточные элементы, которые, предположительно, могут являться апоптотическими тельцами. Наблюдались скопления нейрональных клеток предшественников. В области ствола мозга были выявлены крупные ДНК-синтезирующие клетки, предположительно, являющиеся трансдифференцированными клетками. Полученные данные дают новую информацию о процессах пролиферации и репаративного нейрогенеза в мозге позвоночных.

Ключевые слова: пролиферация; нейрогенез; кета; травма; тегментум.

CELL PROLIFERATION AND EXPRESSION OF MAP 2, VIMENTIN AND NESTIN IN CHRONIC AND REPEATED ACUTE INJURY OF THE MESENCEPHALON OF JUVENILE CHUM SALMON ONCORHYNCHUS KETA

Kapustianov I.A.*, Puschina E.V., Varaksin A.A.
National scientific center of marine biology, Vladivostok,
*ilyaak9772@gmail.com

Abstract

We studied areas of the brainstem and cerebellum of one-year-old Pacific chum salmon Oncorhynchus keta 75 days after the initial chronic injury and 7 days after the repeated acute injury to the area of the mesencephalic tegmentum. The processes of proliferation, cell differentiation, and cell migration were studied by IHC labeling of nestin, vimentin, and microtubulin associated protein (MAP 2), as well as experimental IHC labeling of bromodeoxyuredin. In the areas of the brainstem and cerebellum, radial glia fibers were identified, along which progenitor cell migration occurs. Also in these areas, we observed granular cellular elements, which, presumably, may be apoptotic bodies. Clusters of neuronal progenitor cells were observed. In the region of the brainstem, large DNA-synthesizing cells were identified, presumably being transdifferentiated cells. The obtained data provide new information about the processes of proliferation and reparative neurogenesis in the brain of vertebrates.

Keywords: proliferation; neurogenesis; chum; trauma; tegmentum.

Введение

В период эмбрионального развития позвоночных происходит рост и развитие нервной ткани, формирование отделов головного мозга, деление нейральных стволовых клеток и дифференцировка клеток в зрелые нейроны и глию. Однако, и в постембриональный период во многих областях мозга могут продолжаться процессы конститутивного и репаративного нейрогенеза.

Изучение свойств вНСК не млекопитающих позвоночных проводилось главным образом на теленцефалоне Danio rerio, у которого в этом отделе мозга обнаружены нейральные стволовые клетки (НСК) с фенотипом РГ и промежуточные предшественники [7-10].

Ранее нами были исследованы процессы пролиферации, нейрогенеза и глиогенеза в области мезенцефалического тегментума

молоди кеты в интактных животных и в ответ на травматическое воздействие [2]. Проведённые исследования показали наличие обширной пролиферирующей популяции клеток в перивентрикулярной области тегментума, маркируемой с помощью PCNA. Наличие обширных пролиферативных зон в тегментуме свидетельствует о высокой интенсивности процессов взрослого нейро- и глиогенезов, которые были подтверждены с помощью соответствующего ИГХ-маркирования нейронального HuCD и GFAP Было показано что в ответ на повреждение тегметума наблюдалось возникновение новых пролиферативных зон, формирование новых нейрогенных ниш в различных областях тегментума, ускорение клеточной дифференцировки, а также увеличение количества клеток с эпендимоглиальным и радиоглиальным фенотипом. Полученные данные вносят существенный вклад в изучение конститутивного и репаративного нейрогенеза позвоночных животных [2].

Целью настоящей работы является исследование пролиферативной активности мозга молоди Тихоокеанской кеты Oncorhyncus keta через 75 после нанесения хронической травмы и через 7 дней после нанесения повторной травмы в область мезенцефалического тегментума.

В задачи исследования входило:

1. Исследовать пролиферативную активность клеток ствола мозга методом BrdU маркирования
2. Охарактеризовать фенотип популяций нейрональных клеток предшественников в стволе мозга и мозжечке с помощью ИГХ маркирования виментина и нестина.
3. Охарактеризовать фенотип нейронов и нейрональных клеток предшественников в стволе мозга и мозжечке с помощью ИГХ маркирования MAP2.
4. Выявить признаки изменения пролиферативной и апоптотической активности в стволе мозга и мозжечке.

Материалы и методы

В работе было использовано 12 годовалых особей молоди кеты Oncorhynchus keta с длиной тела 14,2–22,8 см и массой 18–68 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 темнового периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание

растворенного кислорода вводе – 7–10 мг/дм3, 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 (pH 7.2). После 30 мин префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 2 ч при 4°С. Затем в течение двух суток выдерживали в 30% растворе сахарозы при 4°С 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. Между полушариями оптического тектума, по средней линии мозга, наносили рану глубиной в 3 мм в парасагиттальном направлении. Зона травмы охватывала оптический тектум и тегментум среднего мозга и не затрагивала другие части головного мозга. Сразу после механического повреждения животных выпускали в аквариум для их восстановления и дальнейшего мониторинга. Через 68 дней после нанесения первичной травмы проводилось нанесение повторной острой травмы по аналогичной методике.

Иммуногистохимия. В работе были использованы маркеры клеточной пролиферации, нейрональных клеток предшественников: виментин, нестин и микротубулин-ассоциированный протеин (MAP2) [11]. Для исследования экспрессии виментина и нестина после первичного хронического (75 дней) и острого повторного (1 неделя) травматического повреждения мезенцефаличесткого тегментума молоди кеты использовали иммунопероксидазное маркирование на замороженных свободно плавающих срезах конечного мозга. В работе были использованы моноклональные мышиные антитела к нестину, виментину и микротубулин-ассоциированному протеину (MAP2) фирмы Abcam, (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.

Экспериментальное маркирование бромдезоксиуридина. Для исследования процессов пролиферации после первичного хронического (75 дней) и острого повторного (1 неделя) травматического повреждения мезенцефаличесткого тегментума молоди кеты использовали ИГХ маркирование BrdU. Рыб подвергали общей анестезии путем погружения в резервуар с 2% MS 222 (St Louis, LO, USA). Травматическое повреждение глубиной 1 мм, наносили в парасагиттальном направлении тегментума. В контрольной группе животных и после травмы тегментума (n = 5 для каждой группы) одновременно с повреждением мозга животным вводили внутрибрюшинную инъекцию раствора BrdU 10 мг / мл (Sigma-Aldrich, США) в дозе 20 мкл/г вес тела. После 7-дневного периода после инъекции мозг рыб извлекали для дальнейшей подготовки. Животным контрольной группы (n = 5) проводили только инъекцию BrdU. Сразу после травматического повреждения животных отпускали в общий резервуар с пресной водой для их восстановления и дальнейшего мониторинга.

Для дальнейшего ИГХ исследования рыб анестезировали в кювете с 0.1% раствором трикаин метан сульфоната MS-222 в течение 5 мин, вскрывали череп и извлекали головной мозг. Далее мозг целиком заливали в парафин по общепринятой методике (Меркулов, 1969), после чего изготавливали серийные поперечные срезы мозга толщиной 7 мкм, которые монтировали на желатинизированные предметные стекла и оставляли до полного высыхания. После этого срезы были депарафинированы по стандартному гистологическому протоколу (Меркулов, 1969). На последнем этапе промывали в дистиллированной воде 3 мин. Далее срезы были обработаны в соответствии с протоколом по ИГХ маркированию BrdU [12]. Для раскручивания двухцепочечной структуры ДНК проводили кислотный

гидролиз (www.thermofisher.com). Срезы мозга инкубировали в 1 М HCl в течение 10 минут на льду. Далее инкубировали в 1 М HCl в течение 10 минут при комнатной температуре, затем 20 минут при температуре 37°С. Сразу после инкубации с кислотами срезы были нейтрализованы в 0.1 М боратном буфере в течение 10 минут при комнатной температуре, промыты в фосфатном буфере PBS (pH 7.4) и трижды промыты.

Микроскопия. Для визуализации процессов пролиферации, нейрогенеза, глиогенеза и проведения морфологического и морфометрическогоанализа 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×, радиальных волокон – при увеличении 10×.

Результаты

BrdU – маркированные клетки в мезенцефалическом тегментуме. В мозге молоди кеты с первичной хронической травмой (75 дней) и повторной острой травмой (7 дней) мезенцефалического тегментума в зонах ствола мозга наблюдаются цепочки BrdU маркированных клеток размером 8,5 ± 2 мкм / 5,2 ± 1 мкм. Также наблюдаются крупные BrdU маркированные клетки размером 31,31 ± 9,5 мкм / 18,8 ± 1,3 мкм (рис. 1).

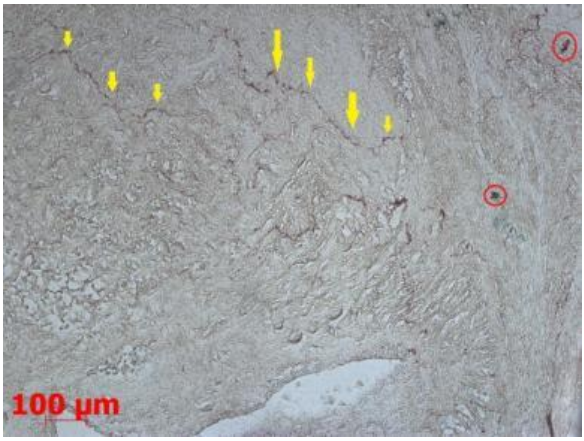


Рис. 1. Характеристика BrdU-маркированных клеток в стволе мозга молоди кеты через 75 дней после хронической и через 7 дней после повторной острой травмы тегментума. Овалами отмечены крупные BrdU – маркированные клетки. Стрелками отмечены цепочки BrdU – маркированных клеток

Экспрессия MAP2 в мезенцефалическом тегментуме. У молоди кеты с первичной хронической травмы (75 дней) и повторной острой травмы (7 дней) мезенцефалического тегментума в зонах ствола мозга наблюдаются MAP2 позитивные клетки различного фенотипа. В дорсальной части ствола мозга обнаружены MAP 2 позитивные клетки размером 11,89 мкм ± 1,2 / 9,34 ± 0,9 мкм.

В дорсальной и вентромедиальной частях ствола мозга также наблюдаются MAP2 позитивные клетки, внешне представленые гранулосодержащими элементами цитоплазмы состоящими из внутренней и внешней частей. Размеры большого / малого диаметров иммунопозитивных клеток в дорсальной области составляли 14,5 ± 4 мкм / 12,3 ± 3,5 мкм для внутренней части и 24,1 ± 6,6 мкм / 20,7 ± 4,6 мкм для внешней части. Размеры большого / малого диаметров иммунопозитивных клеток в вентромедиальной области составляли 15,4 ± 0,7 мкм / 14,3 ± 1,6 мкм для внешних частей, внутри которых могут наблюдаться гранулы размерами 5 ± 2,2 мкм / 3,2 ± 1,1 мкм (рис. 2).

В вентромедиальной зоне были выявлены направляющие, вдоль которых обнаружены MAP2 позитивные клетки с размерами 6,13 ± 2,1 мкм / 3,6 ± 1 мкм.

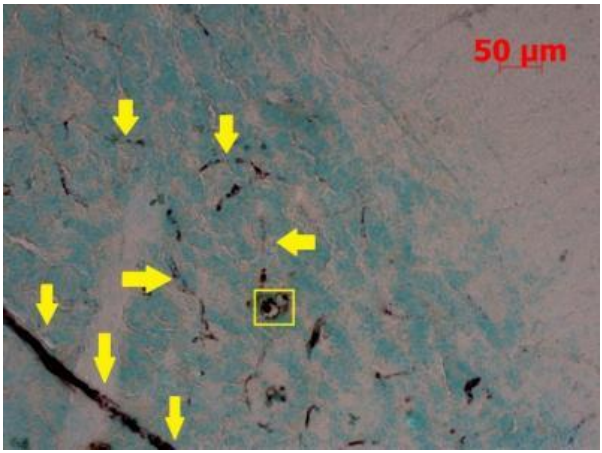


Рис. 2. Характеристика МАР 2-экспрессирующих клеток в стволе мозга молоди кеты через 75 дней после хронической и через 7 дней после повторной острой травмы тегментума. Квадратом обозначены МАР 2-экспрессирующие гранулосодержащие элементы. Стрелками обозначены волокна с МАР 2-экспрессирующими клетками.

В базолатеральной и в промежутке между базомедиальной и базолатеральной областми мозжечка наблюдались сплетения волокон с МАР2 позитивными клетками вдоль этих волокон. Количество сосудов на профильное поле, наблюдаемых базолатеральной части при 10 – кратном увеличении, было равно 22 ± 2,2. Количество волокон на профильное поле, наблюдаемых в промежутке между базомедиальной и базолатеральной областями при 10 – кратном увеличении, составляло 31 ± 3,1(рис. 2).

Экспрессия нестина в мезенцефалическом тегментуме. В стволе мозга наблюдались мелкие нестин позитивные элементы размером 3,5 ± 0,9 мкм / 2,4 ± 0,8 мкм.

В мозговом стволе и в заслонке были выявлены скопления нестин позитивных клеток. Размеры нестин позитивных клеток в стволе были составляли 5,7 ± 1,2 мкм / 3,6 ± 0,6 мкм. Размеры нестин позитивных клеток в заслонке составляли 8,3 ± 1,2 мкм / 4 ± 0,5 мкм (рис. 3).

Также в стволе мозга и в заслонке и в области первичной травмы наблюдаются нестин экспрессирующие клетки, расположенные вдоль направляющих. Размеры иммунопозитивных клеток,

расположенных вдоль тяжей, составляли 6,9 ± 2,9 мкм / 2,1 ± 0,64 мкм в стволе мозга и 15,6 ± 3,6 мкм / 3,8 ± 0,3 мкм в заслонке (рис. 3).

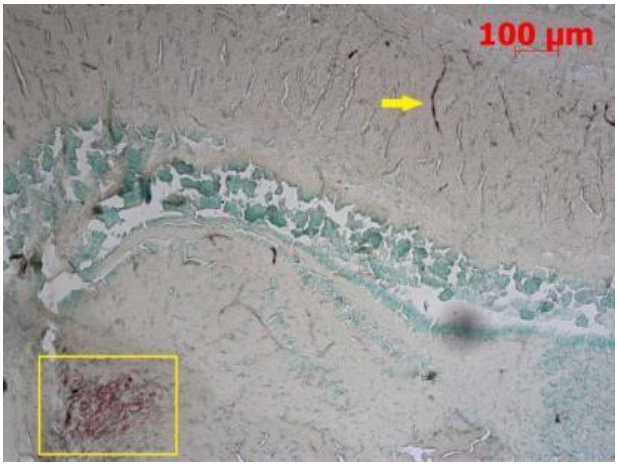


Рис. 3. Характеристика нестин-позитивных элементов в области заслонки мозга молоди кеты через 75 дней после хронической и через 7 дней после повторной острой травмы тегментума. Квадратом обозначены скопления нестин-позитивных клеток. Стрелкой обозначены волокна с нестин-позитивными клетками.

В области мозжечка и тектума обнаружены иммунопозитивные клетки, расположенные вдоль тяжей. Количество тяжей на профильное поле, наблюдаемых в мозжечке при 10 – кратном увеличении, составляло 14 ± 1,4. Количество тяжей на профильное поле, наблюдаемых в тектуме при 10 – кратном увеличении, составляло 27 ± 2,7. Количество клеток на профильное поле, наблюдаемых в тектуме при 20 – кратном увеличении, было равно 16 ± 1,6.

Экспрессия виментина в мезенцефалического тегментума. В вентральной, вентролатеральной и вентромедиальной зонах мозгового ствола были выявлены виментин экспрессирующие клетки, внешне представленые гранулосодержащими элементами цитоплазмы, состоящими из внутренней части и внешней. В вентральной зоне наблюдались гранулосодержащие клетки с размерами 7,68 ± 0,77 мкм / 5,54 ± 0,55 мкм для центральной части и 22,83 ± 2,28 мкм / 19,91 ± 1,99 мкм для внешней части, а также гранулосодержащие клетки без оформленной центральной части и размерами 18,74 ± 7,7 мкм / 15,5 ± 7,6. В вентролатеральной зоне наблюдались иммунопозитивные клетки с размерами 11,8 ± 2,1 мкм / 6,9 ± 1 мкм. Размеры большого / малого

диаметров иммунопозитивных клеток в вентромедиальной области составляли 10,9 ± 3,1 мкм / 6,5 ± 0,4 мкм для центральной части и 29,4 ± 8,9 мкм / 27,5 ± 6,2 мкм для внешней части (рис. 4).

Гранулосодержащие клетки размером 10,2 ± 0,2 мкм / 6,7 ± 2,1 мкм для центральной части и 23,6 ± 2,7 мкм / 19,6 ± 4 мкм также наблюдались в дорсолатеральной части мозжечка.

Виментин позитивные клетки были выявлены в области травмы и в мозжечке вдоль волокон. Размеры иммунопозитивных клеток в мозжечке составляли 4,8 ± 0,8 мкм / 3,2 ± 0,9 мкм. Размеры иммунопозитивных клеток в зоне травмы составляли 6,3 ± 2 мкм / 3,6 ± 1 мкм. Размеры иммунопозитивных клеток в зоне травмы составляли 7 ± 2 мкм / 4,6 ± 1,3 мкм. Количество тяжей на профильное поле, наблюдаемых в зоне травмы при 10 – кратном увеличении, было равно 14 ± 1,4(рис. 4).

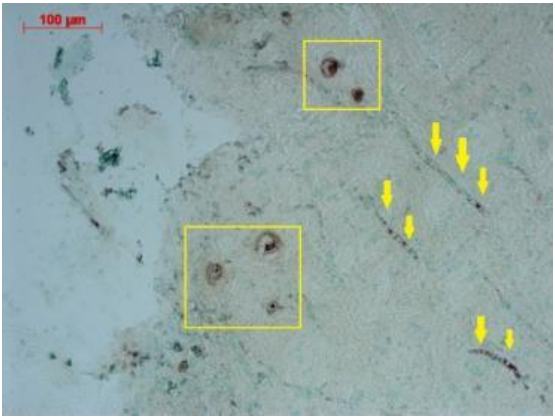


Рис. 4. Характеристика виментин-позитивных элементов в области ствола мозга молоди кеты через 75 дней после хронической и через 7 дней после повторной острой травмы тегментума. Стрелками обозначены волокна с виментин-позитивными клетками. Квадратом обозначены виментин-позитивные гранулосодержащие клетки.

Обсуждение

Для наблюдения за различными клеточными типами, мы использовали антитела к маркеру клеточной пролиферации – бромдезоксиуредин и маркерам нейральных стволовых клеток микротрубочко-ассоциированный белок (MAP 2), нестин и виментин.

Исследования мозга молоди кеты после первичной хронической травмы (75 дней) и повторной острой травмы (7 дней)

мезенцефалического тегментума показали что в стволе мозга и в мозжечке наблюдались виментин- и MAP2-иммунопозитивные элементы, внешне представленые гранулосодержащими элементами цитоплазмы состоящими из внутренней части и внешней. Мы полагаем, что фенотип данных клеток морфологически соответствует апоптотическим тельцам [5]. Известно, что в мозге костистых рыб после повреждения наряду с процессами репаративного нейрогенеза происходит элиминация поврежденных клеток путём апоптоза [13]. Мы полагаем, что наличие гранулосодержащих элеменов, рассматриваемых нами как апоптозные тельца, может быть результатом травматического воздействия

Были выявлены многочисленные тяжи, вдоль которых лежат иммунопозитивные клетки. Данные волокна обнаружены как в стволе мозга, в том числе в зоне первичной травм, так и в мозжечке. В стволе мозга наблюдаются виментин-, нестин- и MAP2 экспрессирующие клетки, лежащие вдоль данных тяжей. Кроме того обнаружены цепочки мелких BrdU-позитивных клеток. В мозжечке обнаружены лежащие вдоль тяжей MAP2 и виментин-экспрессирующие клетки. Мы полагаем, что тяжи представляют из себя волокна радиальной глии, вдоль которых происходит миграция клеток предшественников. Ранее популяция GFAP+ радиальной глии была описана вдоль всего просвета желудочка мозга у карпа Cyprinus carpio [14], форели [15] и других рыб.

В стволе мозга обнаружены крупные BrdU-позитивные клетки. Есть предположение, что данные клетки представляют собой трансдифференцированные нейроны. Результаты исследований на данио показали способность зрелых нейроны при повреждении тектума трансдифференцироваться и сформировать пул пролиферирующих клеток [16].

В стволе мозга и в области заслонки были выявлены скопления нестин-позитивных клеток. Мы рассматриваем данные скопления как зоны нейрогенеза. Таким образом, наличие глиальных волокон, скоплений нестин-позитивных клеток в стволе мозга и в мозжечке дает основания предположить, что в мозжечке молоди кеты наблюдается активная пролиферация и миграция клеток предшественников тегментума.

Выводы

1. В стволе мозга и в мозжечке молоди иммуномаркированные элементы морфологически сходные с фенотипом апоптозных телец.

Мы полагаем, что присутствие данных элементов обусловлено нанесением экспериментального повреждения в область тегментума.
2. Были выявлены волокна радиальной глии вдоль которых наблюдается миграция нейрональных клеток предшественников.
3. В стволе мозга обнаружены крупные BrdU-позитивные клетки, которые могут являться трансдифференцированными нейронами.
4. В стволе мозга и в мозжечке молоди кеты наблюдаются скопления клеток предшественников. Данные скопления, как мы полагаем, могут являться нейрогенными нишами.
5. Наличие глиальных волокон, скоплений клеток предшественников в мозжечке указывает на то, что данной области мозга молоди кеты также идут пролиферативные процессы.

Работа была выполнена в рамках госбюджетной темы «Нейробиология морских организмов и биомедицинские технологии». № Госрегистрации ЕГИСУ 121082600034-5. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемыми уставом ННЦБМ ДВО РАН, и Этической комиссией ННЦМБ ДВО РАН, регламентирующего гуманное обращение с экспериментальными животными.

Литература

1. Курс патологогистологической техники / Меркулов Г.А. Л.: Медицина, 1969.
2. Pushchina, E. V., Kapustyanov, I. A., Varaksin, A. A. Proliferation and neuro- and gliogenesis in normal and mechanically damaged mesencephalic tegmentum in juvenile chum salmon Oncorhynchus keta // Russ. J. Devel. Biol. 2019. Vol. 50. Pp. 59–76.
3. Wilson G. D., McNally N. J., Dische S., Saunders M. I., Des Rochers C., Lewis A. A., Bennett M. H. Measurement of cell kinetics in human tumours in vivo using bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry // British journal of cancer. 1988. Vol. 58. No 4. Pp. 423.
4. Dehmelt L., Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins // Genome Biology. 2005. Vol. 6. No. 204. Pp. 3 – 5.
5. Takano Y. S., Harmon B. V., Kerr J. F. R. Apoptosis Induced By Mild Hyperthermia In Human And Murine Tumour Cell Lines: A Study Using Electron Microscopy And Dna Gel Electrophoresis // Journal Of Pathology. 1991. Vol. 163. Pp. 329-336.
6. Zupanc G. K. Towards brain repair: Insights from teleost fish // Semin. Cell Dev. Biol. 2009. Vol. 20. Pp. 683-690.

7. Pellegrini E., Mouriec K., Anglade I., Menuet A., Le Page Y., Gueguen M. M., Marmignon M. H., Brion F., Pakdel F., Kah O. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish // J. Comp. Neurol. 2007. Vol. 501. Pp. 150–167.
8. Chapouton P., Skupien P., Hesl B., Coolen M., Moore J. C., Madelaine R., Kremmer E., Faus-Kessler T., Blader P., Lawson N. D., Bally-Cuif L. Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells // J. Neurosci. 2010. Vol. 30. Pp. 7961–7974.
9. März M., Chapouton P., Diotel N., Vaillant C., Hesl B., Takamiya M., Lam C. S., Kah O., Bally-Cuif L., Strähle U. Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon // Glia. 2010. Vol. 58. Pp. 870–888.
10. Rothenaigner I., Krecsmarik M., Hayes J.A., Bahn B., Lepier A., Fortin G., Götz M., Jagasia R., Bally-Cuif L. Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate // Development. 2011. Vol. 138. Pp. 1459–1469.
11. Arochena M., Anadón R., Diaz-Regueira S. M. Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (Chelon labrosus), an advanced teleost // J. Comp. Neurol. 2004. Vol. 469. Pp. 413–436.
12. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: Diagnostic toll in biology and medicine. Part I: Historical perspectives,histochemical methods and cell kinetics // Histochem. J. 1995. Vol. 27. Pp. 339–369.
13. Zupanc G.K. Towards brain repair: Insights from teleost fish // Semin. Cell Dev. Biol. 2009. Vol. 20. Pp. 683-690.
14. Kálmán M. Astroglial architecture of the carp (Cyprinus carpio) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP) // Anat. Embryol. (Berl). 1998. Vol. 198. Pp. 409–433.
15. Alunni A., Vaccari S., Torcia S., Meomartini M.E., Nicotra A., Alfei L. Characterization of glial fibrillary acidic protein and astroglial architecture in the brain of a continuously growing fish, the rainbow trout // Eur. J. Histochemistry. 2005. Vol. 49. Pp. 157–166.
16. Lyons, D.A., Guy, A.T., Clarke, J.D. Monitoring neural progenitor fate through multiple rounds of division in an intact vertebrate brain // Development 2003. Vol. 130. Pp. 3427–3436.

© Капустянов И.А, Пущина Е.В., Вараксин А.А., 2022

УДК: 611.824
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.18

МИКРОГЛИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

© Колос Е.А. *, Коржевский Д.Э.
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
* koloselena1984@yandex.ru

Аннотация. Цель настоящего исследования заключалась в оценке изменений микроглии в различных областях шейного отдела спинного мозга молодых (4 месяца) и стареющих (18 месяцев) крыс. Клетки микроглии идентифицировали при помощи антител к кальций-связывающему белку Iba-1. Установлено, что возрастные реактивные изменения микроглиоцитов более выражены в белом веществе СМ, что, вероятно, обусловлено активным участием глиальных клеток в процессах демиелинизации нервных волокон спинного мозга, протекающих на поздних стадиях онтогенеза. Отмечено, что наибольшие изменения претерпевает микроглия дорсального канатика, обеспечивающего восприятие и оценку сенсорной информации, а также последующую двигательную активность. Полученные результаты свидетельствуют о возможном вкладе микроглии в патогенез сенсорных нарушений, связанных со старением.

Ключевые слова: старение, микроглия, спинной мозг, иммуногистохимия, белок Iba-1.

MICROGLIA OF THE RAT SPINAL CORD IN AGING

Kolos E.A. *, Korzhevskii D.E.
Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg
* koloselena1984@yandex.ru

Abstract. The aim of this study was to evaluate changes in microglia in different regions of the cervical spinal cord of young (4 months old) and aging (18 months old) rats. Microglial cells were identified using antibodies to calcium-binding protein Iba1. It has been established that age-related reactive changes in microgliocytes are more pronounced in the white matter compared to the gray matter of spinal cord. This is due to the active

participation of glial cells in the processes of spinal cord nerve fibers demyelination, which occur at the late stages of ontogenesis. It is noted that the microglia of the dorsal funiculus, which provides the perception and evaluation of sensory information, undergoes the greatest changes. Our results indicate a possible contribution of microglia to the pathogenesis of sensory disorders associated with aging.

Keywords: aging, microglia, spinal cord, immunohistochemistry, Iba1 protein.

Введение

Известно, что старение является существенным фактором риска развития заболеваний центральной и периферической нервной системы. В связи с этим в настоящее время активно изучаются клеточные и молекулярные процессы, происходящие при старении. Многочисленные исследования демонстрируют, что клетки микроглии играют важную роль в патогенезе возрастных нейродегенеративных заболеваний [2, 9]. Микроглиоциты представляют собой резидентные иммунные клетки ЦНС, поддерживающие гомеостаз нервной ткани. В ответ на повреждение и изменение гомеостаза микроглиоциты мигрируют, накапливаются в пораженной области и претерпевают морфологические изменения: отростки клеток укорачиваются, степень их ветвления снижается и микроглиоциты переходят в промежуточное «гипертрофированное» или в полностью активированное состояние, приобретая амебоидную форму. Активированная микроглия может приобретать различные фенотипы, высвобождая про- и противовоспалительные молекулы в зависимости от сигналов окружающей среды [3, 7].

Большое количество современных исследований посвящено старению головного мозга [1, 6, 8]. Работы, описывающие особенности реакции микроглии спинного мозга в возрастном аспекте немногочисленны. Основная масса доступных исследований посвящена микроглиальной реакции при травматическом повреждении спинного мозга в условиях старения. Реакция микроглиоцитов СМ на нормальное старение изучена недостаточно. Кроме того, остается неясным, как возрастные изменения микроглиоцитов влияют на развитие заболеваний нервной системы.

Настоящее исследование направлено на изучение возрастных изменений клеток микроглии спинного мозга крыс, а также выявление региональных различий реакции этих клеток при старении.

Материалы и методы

Работа выполнена на самцах крыс Вистар в возрасте 4 мес. (n=4) и 18 мес. (n=4). Все манипуляции проводили 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 молодых и стареющих животных выделяли фрагменты шейного отдела СМ (C_{III}-C_V сегмент). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [5], обезвоживали и заливали в парафин. На гистологических срезах проводили иммуногистохимическое выявление белка Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), используя поликлональные козьи антитела (разведение 1 : 800, AbCam, Великобритания) и вторичные биотинилированные антитела из набора VECTASTAIN® Universal Quick kit (PK-8800) (Vector Laboratories Inc, США) с блокировкой неспецифической иммунореактивности нормальной сывороткой крысы. Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США). Полученные препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия), оснащенного камерой ICC50 (Leica, Германия).

Оценку изменений микроглиоцитов при старении проводили в нескольких зонах спинного мозга: дорсальном сером веществе (I-V пластинка Рекседа), вентральном сером веществе (VI-X пластинка Рекседа), а также в области дорсальных, боковых и вентральных канатиков СМ. В каждой исследуемой зоне спинного мозга молодых и стареющих животных определяли плотность распределения клеток - общее число микроглиоцитов на единицу площади исследуемой области (кл/мм^2). Статистический анализ различий между группами проводили с использованием t- критерия Стьюдента при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

В ходе настоящего исследования были отмечен ряд морфологических различий между микроглией СМ молодых и стареющих крыс, а также отмечены зоны СМ с преобладанием реактивно измененных микроглиоцитов.

В области вентрального и дорсального серого вещества СМ молодых животных идентифицируются многочисленные округлые или овальные Iba-1-содержащие клетки, обладающие несколькими тонкими разветвленными отростками. У стареющих крыс в области вентрального и дорсального серого вещества преобладают

микроглиоциты, обладающие аналогичнными морфологическими признаками рамифицированных клеток. Однако у 18-ти месячных животных единичные микроглиоциты серого вещества проявляют морфологические признаки активации: иммунопозитивные клетки неправильной формы имеют укороченные толстые маловетвящиеся отростки. Нами отмечено, что в сером веществе СМ стареющих животных амебоидные иммунопозитивные клетки отсутствуют. При проведении количественной оценки возрастных изменений популяции микроглии СМ установлено, что плотность распределения Iba-1-иммунопозитивных клеток в вентральном и дорсальном сером веществе СМ при старении не изменяется ($p > 0,05$) (рис. 1).

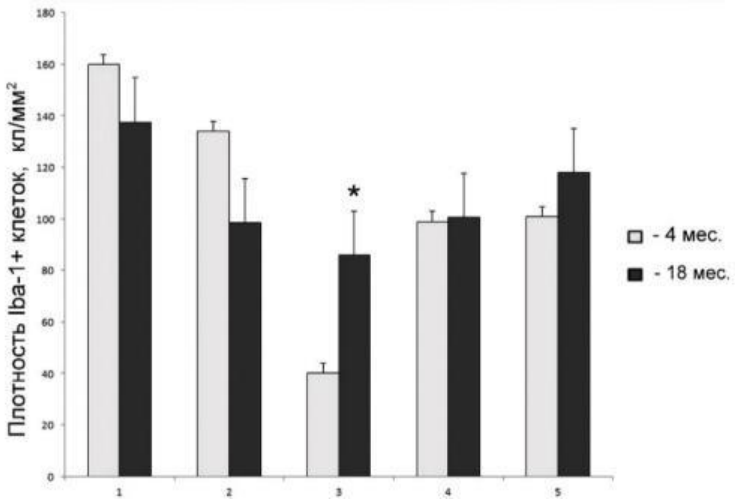


Рис. 1. Изменение плотности популяции микроглии спинного мозга при старении. 1 – дорсальное серое вещество СМ; 2 – вентральное серое вещество СМ; 3 – дорсальный канатик СМ; 4 – латеральный канатик СМ; 5 – вентральный канатик СМ. * – $p < 0.05$

При изучении особенностей микроглиоцитов белого вещества спинного мозга 4-х мес крыс отмечено, что в вентральном, дорсальном и боковом канатиках спинного мозга иммунореактивность проявляют мелкие овальные или округлые клетки с тонкими отростками, идущими параллельно аксональным путям. У животных в возрасте 18 месяцев в области бокового и вентрального канатиков спинного мозга

преобладают иммунопозитивные клетки с аналогичными морфологическими особенностями, характерными для рамифицированных микроглиоцитов. Однако в вентральном белом веществе было отмечено присутствие гипертрофированных иммунопозитивных клеток.

При сравнении распределения и структурных особенностей микроглиоцитов 4- х и 18-ти месячных крыс, в настоящем исследовании было установлено, что наиболее значительные морфологогические изменения при старении претерпевает микроглия дорсальных канатиков СМ. Дорсальный канатик СМ крыс образован восходящими сенсорными (тонкий и клиновидный пучки) и нисходящими двигательными волокнами (кортико-спинальный тракт), которые обеспечивает сенсомоторные функции. Большинство микроглиоцитов этой области СМ стареющих крыс проявляют морфологические признаки активации: иммунопозитивные клетки обладают гипертрофированным клеточным телом и короткими толстыми отростками, утратившими ветвление. В области тонкого пучка спинного мозга нами отмечено присутствие лишенных отростков Iba-1- иммунопозитивных клеток увеличенного размера с тонким ободком цитоплазмы и крупными вакуолями. Единичные гипертрофированные микроглиоциты присутствуют также в области дорсального кортико-спинального тракта.

При количественном анализе популяции микроглиоцитов дорсального канатика СМ установлено, что у стареющих крыс количество иммунопозитивных клеток в этой области возрастает в 2 раза по сравнению с аналогичной областью СМ молодых животных (рис. 1).

Увеличение количества реактивной микроглии в области восходящих и нисходящих проводящих путей СМ у крыс в возрасте 18-ти месяцев может свидетельствовать о начале патологических изменений в сенсорной и двигательной системе. Вероятно, описные в настоящем исследовании значительные морфологические изменения микроглиоцитов дорсального белого вещества СМ стареющих крыс обусловлены демиелинизацией аксонов сенсорной системы и участии клеток микроглии в фагоцитозе фрагментов миелиновых оболочек. Мы также предполагаем, что активация микроглиоцитов дорсального белого вещества при старении может быть вызвана гибелью сенсорных нейронов и их афферентов, образующих тонкий и клиновидный пучки СМ. В нашей предыдущей работе было установлено, что в чувствительном ганглии крыс в возрасте 18 месяцев происходит активация клеток-сателлитов [4], что свидетельствует о метаболических изменениях, происходящих в сенсорных нейронах при старении, и начале дегенеративных изменений их афферентов.

Таким образом, в настоящей работе описаны возрастные изменения клеток микроглии СМ крыс и выявлены региональные

особенности реакции микроглиоцитов на старение. Настоящее исследование показало, что возрастные изменения микроглиоцитов наиболее выражены в области дорсального канатика СМ, обеспечивающего восприятие и оценку сенсорной информации. Полученные результаты свидетельствуют о возможном вкладе микроглии в патогенез сенсорных нарушений, связанных со старением.

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

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/19 от 25 апреля 2019)

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Costa J., Martins S., Ferreira P.A., Cardoso A.M.S., Guedes J.R,. Peça J., Cardoso A.L. The old guard: Age-related changes in microglia and their consequences // Mech Ageing Dev. 2021. Vol. 197: 111512.
2. Hickman S., Izzy S., Sen P., Morsett L., El Khoury J. Microglia in neurodegeneration // Nat Neurosci. 2018. Vol. 21. No. 10. Pp. 1359–1369.
3. Kolos E.A., Korzhevskii D.E. Spinal cord microglia in health and disease // Acta Naturae. 2020. Vol. 12. No. 1. Pp. 4–17.
4. Kolos E.A., Korzhevskii D.E. Immunohistological detection of active satellite cells in rat dorsal root ganglia after parenteral administration of lipopolysaccharide and during aging // Bull Exp Biol Med. 2020. Vol. 169. No. 5. Pp. 665–668.
5. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // Eur J Histochem. 2015. Vol. 59 No. 3. Pp. 233–237.
6. Salas I.H., Burgado J., Allen N.J. Glia: victims or villains of the aging brain? // Neurobiol Disease. 2020. Vol. 143: 105008.
7. Tremblay M.È. The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies // Neuron Glia Biol. 2011. Vol. 7. No. 1. Pp. 67–76.
8. von Bernhardi R., Eugenin-von Bernhardi L., Eugenin J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration // Front Aging Neurosci. 2015. Vol. 7: 124.
9. Xu Y., Jin M.Z., Yang Z.Y., Jin W.L. Microglia in neurodegenerative diseases // Neural Regen Res. 2021. Vol. 16. Pp. 270–280.

© Колос Е.А., Коржевский Д.Э., 2022

УДК: 616.8-091.817, 616-003.98
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.19

СИСТЕМНОЕ ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛА НА СТРУКТУРУ НЕРВНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ВЫНУЖДЕННОЙ АНАЭРОБНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© Лебедева А.И.*, Гареев Е.М., Сироткина И.В., Галаутдинов М. Ф., Муслимов С.А.
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Всероссийский центр глазной и пластической хирургии), г. Уфа, Россия
* Jeol02@mail.ru

Аннотация. Спорт высших достижений сопряжен с экстремальными физическими и эмоциональными нагрузками. Переутомление и перетренированность могут давать симптомокомплекс нарушений деятельности ЦНС. Аллогенный биоматериал является стимулятором регенерации органов и тканей при его локальном использовании. Однако дистанционное воздействие не изучалось. Целью работы явилось исследование структуры коры головного мозга животных после вынужденной физической нагрузки и применения аллогенного биоматериала. Использовались крысы - самцы линии Wistar (200-240 г). Моделью анаэробной физической нагрузки выбрана методика принудительного плавания крыс до полного утомления с грузом (10% от массы тела) в течении 30 дней подряд. В основной группе (n=10) после проведения всех 30-ти тренировок вводили внутримышечно суспензию диспергированного аллогенного биоматериала (БМА) в общем количестве 4 мл. В контрольной группе (n=10) животным вводили физиологический раствор в аналогичные зоны и том же объеме. Через 5 и 21 сутки после инъекций из опыта животных выводили путем инсуфляции летальной дозы паров хлороформа, извлекали головной мозг и проводили гистологические (окраска гематоксилином и эозином), иммуногистохимические (CD 68, GFAP, Bcl-2), электронномикроскопические исследования. Использовали ранговый дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллесу и критерий Манна-Уитни. В контрольной группе развивались патоморфологические изменения в нервной ткани коры головного мозга в предцентральной извилине. Определялись признаки отека

клеток, периваскулярного бассейна, инактивация синаптического аппарата. Дегенерация нейроцитов заканчивалась очаговым глиозом. На протяжении 21 суток данные признаки сохранялись. Увеличивалось количество GFAP$^+$ клеток и клеток теней. А численность Bcl-2$^+$ клеток была снижена, по-сравнению, с основной группой. Через 5 суток после введения БМА признаки отека нервной ткани не определялись. Слои нейроцитов коры головного мозга сохраняли четкую архитектонику. Отмечалась синаптическая активность. Структурные признаки нейроцитов также указывали на их функциональную состоятельность: восстановление энергетического баланса, активация биосинтетических процессов и секреторной деятельности, активировались их кооперации. Содержание CD 68$^+$ макрофагов было повышенным. Аллогенный биоматериал оказывает системное действие на организм животного. Зафиксировано его нейропротекторное и иммуномодулирующее действие.

Ключевые слова: аллогенный биоматериал, кора головного мозга, коррекция, вынужденное плавание, крысы.

SYSTEMIC EFFECT OF ALLOGENEIC BIOMATERIAL ON THE STRUCTURE OF THE NERVOUS TISSUE UNDER CONDITIONS OF FORCED ANAEROBIC PHYSICAL ACTIVITY IN THE EXPERIMENT

Lebedeva A.I.*, Gareev E.M., Sirotkina I.V., Galautdinov M.F., Muslimov S.A.
Bashkir State University, Ufa, Russia
* Jeol02@mail.ru

Abstract. The sport of the highest achievements is associated with extreme physical and emotional stress. Overwork and overtraining can give a symptom complex of disorders of the central nervous system. Allogeneic biomaterial is a stimulator of regeneration of organs and tissues when used locally. However, remote exposure has not been studied. The aim of the work was to study the structure of the cerebral cortex of animals after forced physical activity and the use of allogeneic biomaterial. Male rats of the Wistar line (200-240 g) were used. The model of anaerobic physical activity was chosen as the method of forced swimming of rats until complete fatigue with a load (10% of body weight) for 30 consecutive days. In the main group (n=10), after all 30 training sessions, a suspension of dispersed allogeneic biomaterial (BMA) was injected intramuscularly in a total amount of 4 ml. In the control group (n=10), the animals were injected with

physiological saline in similar zones and in the same volume. 5 and 21 days after the injections, the animals were taken out of the experiment by insufflation of a lethal dose of chloroform vapor, the brain was removed, and histological (hematoxylin and eosin staining), immunohistochemical (CD 68, GFAP, Bcl-2), and electron microscopy studies were performed. Kruskal-Wallace rank analysis of variance and the Mann-Whitney test were used. In the control group, pathomorphological changes developed in the nervous tissue of the cerebral cortex in the precentral gyrus. Signs of cell edema, perivascular pool, inactivation of the synaptic apparatus were determined. Degeneration of neurocytes ended with focal gliosis. For 21 days, these signs persisted. The number of GFAP^{+} cells and shadow cells increased. And the number of Bcl-2^{+} cells was reduced in comparison with the main group. Five days after the administration of BMA, signs of edema of the nervous tissue were not detected. The layers of neurocytes of the cerebral cortex retained a clear architectonics. Synaptic activity was noted. Structural signs of neurocytes also indicated their functional viability: restoration of energy balance, activation of biosynthetic processes and secretory activity, their cooperation was activated. The content of CD 68^{+} macrophages was increased. Allogeneic biomaterial has a systemic effect on the animal's body. Its neuroprotective and immunomodulatory effects have been recorded.

Key words: allogeneic biomaterial, cerebral cortex, correction, forced swimming, rats.

Введение

Спорт высших достижений, как правило, сопряжен с экстремальными физическими и эмоциональными нагрузками, предъявляющими повышенные требования к здоровью. В большинстве случаев переутомление и перетренированность наслаиваются друг на друга, давая симптомокомплекс нарушений деятельности организма, включая ЦНС, которая может рассматриваться как невроз [1]. Переутомление нарушает слаженность взаимодействий между корой головного мозга, нижележащими отделами нервной системы и внутренними органами [2]. Аллогенный биоматериал известен как стимулятор регенерации при его локальном применении, включая скелетную мышечную ткань [3]. Однако, исследования системного влияния, дистантного действия и обратной связи ранее не проводились. Для выявления фармакологического воздействия аллогенного биоматериала на ЦНС проводили тест Порсолта (Porsolt) «отчаяния» или вынужденного плавания до полного утомления с грузом, который отражает состояние депрессии животных. Тест принудительного

плавания представляет собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты [4]. Целью исследования явилось изучение структуры коры головного мозга экспериментальных животных после вынужденной физической нагрузки и применения аллогенного биоматериала.

Материалы и методы

В эксперименте использовались половозрелые крысы - самцы линии Wistar массой 200-240 г 20 голов. Крыс содержали в пластиковых клетках при естественном освещении и температуре 22-24ºС, кормили брикетированными комбикормами. Вода подавалась без ограничений.

Перед началом проведения теста «вынужденное плавание» всех экспериментальных крыс обучали плаванию в течение 3-х дней без груза в течение 10 минут один раз в день.

Моделью анаэробной физической нагрузки была выбрана методика принудительного плавания крыс до полного утомления с грузом - тест Порсолта (Porsolt) или тест отчаяния [5] в модификации (патент на изобретение № 261706 от 21.04.2017 г.). Плавательный тест проводился ежедневно в течение тридцати дней подряд с 9:00 до 11:00 часов утра. Вес животных измеряли ежедневно, исходя их этого, вес груза подбирался в соответствии с весом животного в данном периоде времени и составлял 10% от массы тела.

В основной группе (n=10) после проведения всех 30-ти тренировок вводили внутримышечно суспензию диспергированного аллогенного биоматериала (БМА). Для этого 1 флакон (10 мг) разводили в 5 мл физиологического раствора и получали 0,2% раствор. Производили всего 8 внутримышечных однократных инъекций в мышцы верхних конечностей (двуглавая мышца плеча (m. biceps brachii), поверхностные мышцы сгибатели предплечья - локтевой и лучевой сгибатели запястья (m. flexor carpi ulnaris, m. flexor carpi radialis) и нижних конечностей (в икроножные (m. triceps surae), четырехглавые мышцы бедра (m. quadriceps femoris)). Вводили по 0,5 мл суспензии БМА. В общем количестве 4 мл. Доза БМА была выбрана произвольно. В качестве БМА использовали диспергированную форму биоматериала Аллоплант с размером частиц 50-80 мкм, разработанного в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ г. Уфы. Биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР №87 901-87 от 22.07.1987 года. Для настоящего исследования БМА был изготовлен из

экстрацеллюлярного матрикса сухожилий крыс. В контрольной группе (n=10) животным вводили физиологический раствор в аналогичные зоны и том же объеме.

Через 5 и 21 сутки после инъекций из опыта животных выводили путем инсуфляции летальной дозы паров хлороформа, была проведена декапитация и извлечение головного мозга. Для проведения гистологического исследования кусочки ткани предцентральной извилины 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), которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Для иммуногистохимических исследований парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первичного антитела применяли: CD 68 в разведении 1:300 (клон ED1), Gfap в разведении 1:300 bcl-2, (Santa Cruz Biotechnology, США). Для окрашивания использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Для электронномикроскопического исследования кусочки тканей фиксировали в 2,5%-ном растворе глютаральдегида, приготовленного на какодилатном буфере (pH 7,2–7,4) с дофиксацией в 1%-ном растворе OsO4 на том же буфере. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-812 по общепринятой методике. Предварительно готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, и окрашивали их толуидиновым синим на 2,5%-ном растворе безводной соды. На данных срезах выбирали участки для электронно-микроскопического исследования. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме EM UC 7 (Leica, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 kB.

Подсчет клеток производили в 20-и полях зрения каждого образца (n=5). Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Использовали ранговый дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллесу: медиана (Me) и квартили (Q1 – 25 %; Q3– 75 %) и критерий Манна-Уитни для сравнения результатов отдельных сроков наблюдения внутри одной серии опытов

или между ними [6]. Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$. Использовали статистический пакет программ Statistica 10,0.

Результаты и обсуждение

При патоморфологическом анализе обнаружилось, что после вынужденного плавания с грузом и введения физиологического раствора через 5 суток в коре головного мозга предцентральной извилины прослеживались все слои клеток, характерные для коры больших полушарий. Однако, встречалось много гиперхромных пикноморфных нервных клеток средних и мелких размеров с плотным удлиненным ядром и изрезанными краями, содержащие плотную осмиофильную нуклеоплазму, в которой выявлялись признаки дезорганизации и конденсации хроматина. В оптически темной цитоплазме содержались гипертрофированные комплексы Гольджи с расширенными каналами и признаками застоя секрета в них, конденсация зернистой цитоплазматической сети. Данные клетки часто выявлялись в непосредственном контакте с макроглиальными клетками – астроцитами. Перинуклеарная цитоплазма астроцитов была оптически светлой за счет накопления вакуолей и тотального разрушения с последующей редукцией цитоплазматических органелл. У астроцитов отечными и с признаками деструкции органелл были не только сами тела, но и терминальные их отростки, окружающие капилляры. В них наблюдались липофусциновые включения (пигмент "изнашивания" или старения клеток). Также, отмечалось утолщение отдельных участков базальной мембраны, большое количество пиноцитозных пузырьков в цитоплазме эндотелиоцитов и перицитов, микровезикулярные тельца, что не характерно для нормы. Просвет капилляров был не свободный - заполнен клеточными фрагментами и различными включениями (рис. 1).

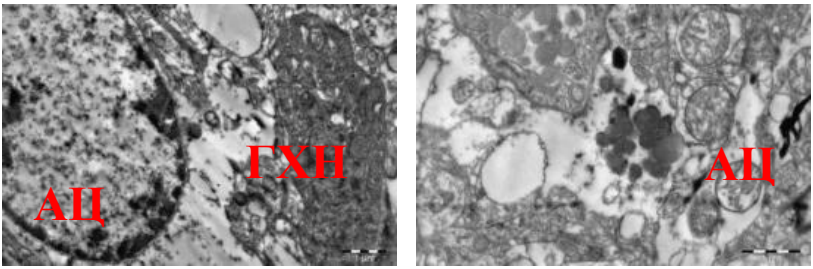


Рис. 1. Отек астроцитов в коре головного мозга предцентральной извилины крысы после вынужденного плавания и внутримышечного введения физ. раствора через 5 суток. А-Контакт астроцита (АЦ) и пикноморфного нейрона (ГХН) В- Отек концевых ножек астроцитов (АЦ). Электронограмма.

Следовательно, наблюдались признаки перицеллюлярного и периваскулярного отека, что является свидетельством нарушения гематоэнцефалического барьера.

Профили нейроцитов были резко расширены, органеллы вакуолизированы, митохондрии расширены, округлые с частичной фрагментацией крист. Синаптический аппарат был развит слабо (рис. 2).

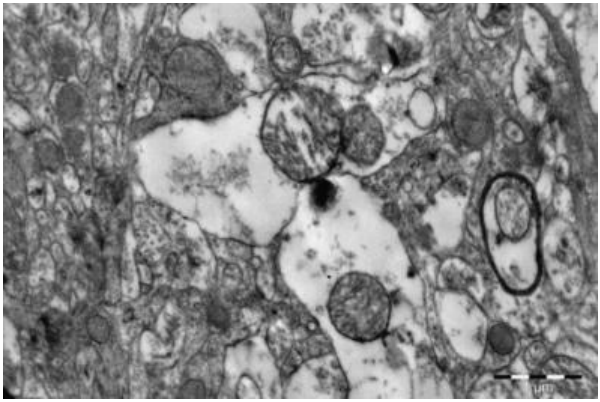


Рис. 2. Вакуолизация нейропиля в коре головного мозга предцентральной извилины крысы после вынужденного плавания и внутримышечного введения физ. раствора через 5 суток. Электронограмма.

Во внутреннем пирамидном слое наряду с небольшим количеством гиперхромных нейроцитов наблюдались светлые клетки –

тени («тающие нейроны»), возникшие вследствие их хроматолиза (необратимые некробиотические изменения). Клетки микроглии часто выявлялись в тесном контакте с некробиотически измененными нейроцитами - клетками Беца.

Через 21 сутки после внутримышечного введения физиологического раствора все слои нейронов коры головного мозга просматривались. Наружный зернистый слой был истончен и разрежен. В окружающей ткани мозга сформировались зоны локального скопления глиальных клеток - глиальные рубцы. Обнаруживались гиперхромные нейроциты в состоянии запрограммированной клеточной гибели - апоптоза. Ядра данных клеток были гиперхромными с конденсированными глыбками. Эухроматин отсутствовал. Цитоплазма отмечалась повышенной электронной плотности за счет распыления рибосом. Цистерны комплекса Гольджи вакуолизированы, резко расширены, удлинены. Наблюдалась их гипертрофия. Митохондрии темные, разрушены, кристы не определялись. В цитоплазме обнаруживались многочисленные фагосомы и остаточные тельца (рис. 3).

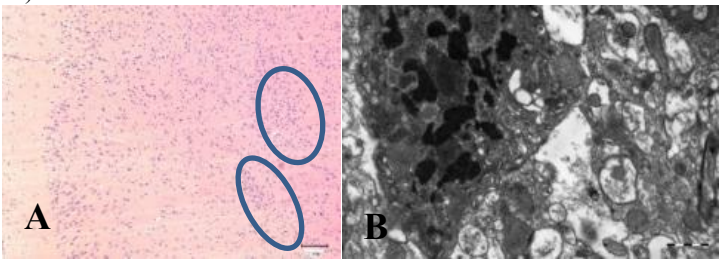


Рис. 3. Морфологические изменения нервной ткани в коре головного мозга предцентральной извилины крысы после вынужденного плавания и внутримышечного введения физ. раствора через 21 сутки. А - Очаговая пролиферация глиальных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. В - Апоптоз гиперхромного нейроцита. Электронограмма.

Так, спустя 21 сутки сохранялись признаки нарушения трофики, гематоэнцефалического барьера. В нейронах определялась деструкция пластинчатых структур, накопление пигмента старения. Отмечались апоптозно-измененные клетки, разрастание глии.

Через 5 суток в аутопсийном материале коры головного мозга крыс в опытной группе патоморфологических признаков в виде отека клеток и воспалительной клеточной инфильтрации не выявлено. На

гистологических препаратах можно было определить все слои коры головного мозга. У пирамидальных нормохромных нейроцитов в данном периоде выявлялись признаки мозаичной структурно-функциональной активности. С одной стороны, ядро было крупное, очерчено четкой двойной кариолеммой, в которой выявлялись ядерные поры. Эухроматин равномерно заполнял всю кариоплазму. В цитоплазме обнаруживались разнокалиберные митохондрии от округлых до вытянутых. Ламеллярные кристы были четкие параллельные, но местами набухшие и разрушенные. Митохондриальный матрикс светлый, умеренно отечный. Определялись признаки гиперплазии пластинчатого комплекса Гольджи. Также, в цитозоле наблюдались как рибосомальные розетки, так и свободные рибосомы. Морфологические характеристики ядерных элементов и цитоплазмы этих клеток свидетельствовали об их усиленной функциональной деятельности. Данные нейроны образовывали контакты между собой (рис. 4).

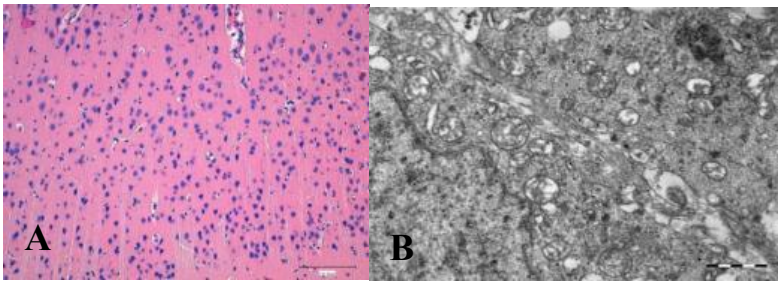


Рис. 4. Строение неокортекса крысы предцентральной извилины после вынужденного плавания и введения БМА через 5 суток. А – Кора головного мозга. Окраска гематоксилином и эозином. В - Межнейронные контакты. Электронограмма.

Через 21 сутки после внутримышечного введения БМА слои нейроцитов коры большого мозга четко прослеживались. Признаки отечных явлений периваскулярного и перицеллюлярного пространств не обнаруживались. Нейропиль плотный, не разреженный. Гемокапилляры имели плотную четко очерченную базальную мембрану, которая образовывала расщепления. В данных дупликатурах располагались перициты. Периваскулярное пространство было без патологических изменений и включений. К базальной мембране прилегали концевые ножки астроцитов, которые плотно охватывали гемокапилляр и формировали муфту. В периваскулярном поле

отмечены многочисленные аксоно-дендритные и аксоно-аксонные синапсы (рис. 5).

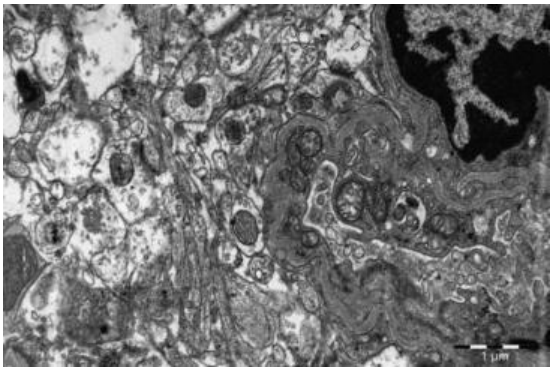


Рис. 5. Нейропиль и гемокапилляр после вынужденного плавания и внутримышечного введения БМА через 21 сутки. Электронограмма.

При иммуногистохимическом определении некоторых функционально значимых клеток было выявлено, что на пятый день наблюдения численность $GFAP^+$ клеток в основной группе оказалась существенно и значимо ниже, чем в контрольных группах ($Z=3,7$ ($p<0,0001$). На 21-й день, в основной, и в контрольной группе произошло существенное (местами двукратное) и значимое ($Z=2,1 \div Z=4,92$, $p<0,04 \div p<<0,0001$) снижение численности GFAP-клеток. Однако, при применении БМА уровень численности GFAP-клеток оказался значимо ниже, чем в контрольной группе ($Z=3,0$ ($p<0,002$)). GFAP проявляется в цитоплазме астроцитов, которые выполняют трофическую, опорную роль, формируют глиальную оболочку и гемато-энцефалический барьер, изолируют рецептивные поверхности нейронов от посторонних афферентных влияний, но нервные импульсы не проводят [7]. Репаративная функция заключается в пролиферации и замещении погибших нервных клеток. Следовательно, он является маркером глиоза в коре головного мозга.

Через 5 суток уровни содержания $Bcl\text{-}2^+$ клеток в основной группе оказались кратно и значимо ($Z=3,5 \div Z=4,25$, $p<0,0005 \div p<<0,0001$) выше, чем в контрольных группах. На 21-й день численность $Bcl\text{-}2^+$ клеток в основной группе, увеличилась ($Z=4,0$ ($p<<0,0001$)). В контрольной группе численность $Bcl\text{-}2^+$ клеток, напротив, значимо снизилась ($Z=2,18$ ($p<0,03$)). Bcl-2 - подавляет апоптоз во многих клеточных системах, включая

лимфогематопоэтические и нейрональные клетки. Регулирует клеточную смерть, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны [8].

На пятый день в основной группе численность CD-68^{+} клеток оказалась значимо ($p<0,004$) выше, чем в контрольной группе. На 21-й день в основной группе численность CD-68^{+} клеток значимо возросла ($Z=5$, $p<<0,0001$). В контрольной группе, напротив, существенных и значимых изменений не произошло ($Z=1,1 \div Z=0,1$, $p>0,24 \div 0,93$) и, как следствие, значимое ($Z=5,49 \div Z=5,83$, $p<0,0001$) превышение данных основной группы над контрольной становилось еще более контрастным. CD-68 – маркер фагоцитарных макрофагов. Им служит микросиалин – фермент вторичных лизосом. CD-68 в коре головного мозга отмечен в микроглиальных клетках [9].

Численность клеток-теней в основной группе, существенно и значимо снизилась со временем ($Z=3,1$ ($p<0,002$)). И численность клеток-теней в основной группе оказалась кратно и значимо ($Z=5,56 \div Z=5,68$, $p<<0,0001$) была ниже, чем в контрольной группе во все сроки наблюдения (Таблица).

Табл. Уровень численности GFAP^{+}, Bcl-2+, CD-68^{+} клеток и клеток теней на 5-й и 21-й дни наблюдения.

численность клеток	**GFAP^{+}**	**Bcl-2^{+}**	**CD-68^{+}**	**клетки тени**
Основная группа (5-й дней)	Me=15 (13, 18)	Me=22,5 (20, 25)	Me=1 (0 , 2)	Me=14 (12, 18)
Основная группа (21-й день)	Me=9 (7, 11)	Me=31 (27, 34)	Me=3 (2 , 3)	Me=3 (3, 5)
Контрольная группа (5-й день)	Me=26 (21, 28)	Me=8,5 (6, 12)	Me=0,5 (0 , 1)	Me=21 (10, 36)
Контрольная группа (21-й день)	Me=13 (11, 15)	Me=6 (5, 7)	Me=1 (0 , 2)	Me=18 (9, 23)

Известно, что БМА – бесклеточный экстрацеллюлярный матрикс аллогенного происхождения, содержит в своем составе коллаген, гликозаминогликаны и протеогликаны [10]. Фармакологическое действие его заключается в стимуляции регенерации тканей при локальном применении, которое активирует ангиогенез, вызывает хемоаттракцию мезенхимных стволовых клеток и стимуляцию их дифференциации с последующей индукцией в тканеспецифичные ткани. Также, он является ингибитором фиброза при заживлении различных тканей [11; 12]. Свой спектр влияний БМА осуществляет через систему мононуклеарных фагоцитов – макрофагов

М1, которые мигрируют в ответ на имплантацию биоматериала и фагоцитируют его, приобретая особый фенотип. Т.е., является иммуностимулятором клеточного звена иммунитета [13]. Дистантное влияние продуктов биодеградации БМА на сегодняшний день не изучено. Можно предположить, при введении БМА на мышцы конечностей, которые подвергались интенсивной физической нагрузке, оказывалось актопротекторное воздействие. Нормоксические мышечные ткани могут способствовать и иммунноадаптивной защите различных тканей, включая нервную. CD-68 макрофаги в нервной ткани оказывают аналогичное действие, подавляя глиоз ткани. Происходит восстановление, стабилизация или стимуляция ангиогенеза, которая наблюдается в основной группе. За счет этого поддерживается нейрогуморальный гомеостаз, он оказывает нейропротективное воздействие и приводит к снижению хроматолиза в нейроцитах, что подтверждается повышением количества bcl-2^+ клеток в основной группе, а, следовательно, и снижением численности $GFAP^+$ клеток и клеток теней.

Вынужденная анаэробная физическая нагрузка способствовала развитию патоморфологических изменений в нервной ткани коры головного мозга в предцентральной извилине. В контрольной группе определялись признаки отека клеток, нейропиля, периваскулярного бассейна, инактивация синаптического аппарата. Пикноз и хроматолиз нейроцитов заканчивались очаговым глиозом. Причем, на протяжении 21 суток данные признаки сохранялись. Увеличивалось количество $GFAP^+$ клеток и клеток теней. А численность Bcl-2^+ клеток была снижена в сравнении с основной группой.

Через 5 суток после введения БМА в условиях длительного вынужденного плавания с грузом признаки отека нервной ткани не определялись. Слои нейроцитов коры головного мозга сохраняли четкую архитектонику. Отмечалась синаптическая активность. Структурные признаки нейроцитов также указывали на их функциональную состоятельность: восстановление энергетического баланса, активацию биосинтетических процессов и секреторной деятельности, а также их кооперации. Содержание CD 68^+ макрофагов было повышенным.

Следовательно, на основании полученных результатов можно заключить, что аллогенный биоматериал оказывает системное действие на организм животного. При локальном введении его в мышцы оказывает нейропротекторное и иммуномодулирующее действие.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00124-21-00, утвержденного 23.12.2020.

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

Литература

1.Филиппов М. М. Психофизиология функциональных состояний / М. М. Филиппов. – 2-е изд., стер. – Киев: Вид. дім «Персонал», 2012. – 240 с.

2.Ильин В.Н., Алвани А.Р., Распространенность и формирование хронического утомления у квалифицированных спортсменов // Национальный университет физического воспитания и спорта Украины. 2016. №3. С 11-17.

3.Лебедева А.И., Муслимов С.А., Вагапова В.Ш., Щербаков Д.А. Морфологические аспекты регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной аллогенным биоматериалом // Практическая медицина. 2019. Т. 17. № 1. С. 98-102.

4.Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В. Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина. 2011. № 1. С. 72–74.

5.Porsolt R.D., Anton G., Blavet N. Et al. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment //Europ. J. Pharmacol. – 1978. – v. 47. – P. 379-391.

6.Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера. 2002. 312 с.

7.Flanagan EP, Hinson SR, Lennon VA, et al. Glial fibrillary acidic protein immunoglobulin G as biomarker of autoimmune astrocytopathy: analysis of 102 patients // Ann Neurol. 2017. 81. Pp. 298–309.

8.Ouyang Y.-B., Giffard R. G., Micrornas Affect Bcl-2 Family Proteins In The Setting Of Cerebral Ischemia // Neurochem Int. 2014 Nov; 0. Pp. 2–8. doi: 10.1016/j.neuint.2013.12.006

9.Stankov A, Belakaposka-Srpanova V, Bitoljanu N, Cakar L, Cakar Z, Rosoklija G. Pril Visualisation of Microglia with the use of Immunohistochemical Double Staining Method for CD-68 and Iba-1 of Cerebral Tissue Samples in Cases of Brain Contusions. // Makedon Akad

Nauk Umet Odd Med Nauki. 2015;36(2). Pp. 141-145. doi: 10.1515/prilozi-2015-0062.
10. Хасанов Р.А. Инъекционная форма аллотрансплантатов серии «Аллоплант». Получение, анализ и биологическая активность: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармакологических наук. Пермь. 1999, 24 с.
11. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Попов С.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Аллогенный биоматериал – индуктор регенерации ишемически поврежденного миокарда в эксперименте // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2021; 65(1). С. 60-69. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.60-69.
12. Лебедева А. И., Муслимов С. А., Гареев Е. М., Попов С. В., Афанасьев С. А. Стимуляция аутологичных прогениторных и коммитированных клеток в ишемически поврежденном миокарде // Российский кардиологический журнал. 2018; 23(11). С. 123–129. http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-11-123-129.
13. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Роль макрофагов в регенерации мышечных тканей, индуцированных аллогенным биоматериалом // Российский иммунологический журнал. –2019. Т. 13 (22). № 2. С.849-851.

© Лебедева А.И., Гареев Е.М., Сироткина И.В.,
Галаутдинов М. Ф., Муслимов С.А., 2022

УДК: 616.89
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.20

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ И ИХ МОДУЛЯЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ

© Наймушина Л.Д., Аисансе Манджоло Тчанг, Ив Нсала Лемба, Беляков В.И.
ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» (Самарский университет), Самара, Россия
*ladanaim@mail.ru

Аннотация. Проблема влияния воспаления на процессы высшей нервной деятельности до настоящего времени является актуальной и, в частности, подразумевает анализ безопасности и эффективности воздействия биологических регуляторов с нейротропным и иммуномодулирующим потенциалом. Цель исследования – изучить особенности воздействия липополисахарида Salmonella tiphy на поведенческие реакции взрослых крыс в различных тестовых установках в зависимости от активности мелатонинергической системы. Крысам группы А ежедневно в течение 10 суток в утреннее время внутрибрюшинно вводился раствор ЛПС Salmonella typhi. Крысы группы В наряду с ЛПС перорально получали мелатонин. Поведение животных оценивалось в установках для исследования двигательной активности и тревожности: открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт. Установлено, что ежедневное введение крысам экспериментальной А группы ЛПС (50 мкг/кг, внутрибрюшинно) в течение 10 суток приводит к формированию особого паттерна поведения с низким уровнем ориентировочно-исследовательской активности на фоне повышенной тревожности в отличие от контрольной группы. Крысы группы В, получавшие сочетанное воздействие ЛПС и мелатонина (0,3 мг/кг, перорально) отличались более высоким уровнем различных вариантов двигательной и исследовательской активности в условиях относительно низкой тревожности в сравнении с крысами первой группы. В работе обсуждаются особенности и механизмы формирования «болезненного» поведения в условиях экспериментальной модели воспаления в зависимости от уровня активации компонентов мелатонинергической системы. Заключение.

На основании проведенного исследования сделаны выводы: 1. Воздействие ЛПС Salmonella tiphy вызывает ограничение двигательной и исследовательской активности и обладает протревожным эффектом. 2. Мелатонин оказывает модулирующее влияние на поведение крыс и, в целом, ограничивает проявления «болезненного поведения». 3. Поведенческие эффекты мелатонина в условиях используемой модели воспаления (введение бактериального ЛПС), вероятно, связаны с его способностью оказывать иммуномодулирующее (противовоспалительное) и нейротропное действие.

Ключевые слова: поведение, липолисахарид, воспаление, крысы.

THE EFFECT OF SALMONELLA TIPHY LIPOPOLYSACCHARIDE ON THE RATS' BEHAVIORAL REACTIONS DEPENDING ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE MELATONERGIC SYSTEM

Lada D. Naimushina, Aisance M. Tchang, Yves N. Lemba, Vladimir I. Belyakov
Samara University
*ladanaim@mail.ru

Abstract. The problem of the influence of inflammation on the processes of higher nervous activity is still relevant. In particular, it implies an analysis of the safety and effectiveness of biological regulators effects with neurotropic and immunomodulatory potential. The aim of the study – the features of the effect of Salmonella tiphy lipopolysaccharide (LPS) on motor, research activity and anxiety level were studied on adult male rats of the Wistar line with different levels of melatonergic system activity using a set of tests. It was found that daily injection of LPS to rats of the first experimental group (50 mcg / kg, intraperitoneally) for 10 days leads to the formation of a special pattern of behavior with a low level of tentative research activity in presence of increased anxiety. The rats of the second group received combined exposure to LPS and melatonin (0.3 mg/kg, orally) distinguished a higher level of various variants of motor and research activity in conditions of relatively low anxiety in contrast the rats of the first group. The paper discusses the features and mechanisms of the formation of "painful" behavior in an experimental model of inflammation, depending on the level of activation of the components of the melatonergic system. Conclusions. Theoretical and practical results are the following: 1. Exposure to Salmonella tiphy LPS causes a restriction of motor and research activity and has a pro-anxiety effect. 2. Melatonin has a

modulating effect on the rats' behavior. In general, it limits the manifestations of "painful behavior". 3. The behavioral effects of melatonin in the conditions of the inflammation model use (injection of bacterial LPS) are probably related to its ability to have an immunomodulatory (anti-inflammatory) and neurotropic effect.

Keywords: behavior, lipolysaccharide, inflammation, rats.

Введение

В настоящее время процессы воспаления на уровне структур центральной нервной системы рассматриваются как значимые триггеры нарушения координирующих функций мозга и возникновения ряда нейродегенеративных заболеваний [1, 2]. Между тем, мало изученной остается проблема влияния воспалительных процессов на организацию и реализацию различных компонентов адаптивного поведения. Актуальным является поиск и изучение модуляторов, способных безопасно и эффективно профилактировать нарушения процессов высшей нервной деятельности в условиях воспаления.

Цель исследования – изучить особенности влияния экспериментальной модели воспаления (действие липополисахарида *Salmonella tiphy*) на поведенческие реакции взрослых крыс в различных тестовых установках в зависимости от активности мелатонинергической системы.

Материал и методы

Исследование выполнено на 24 крысах-самцах линии Wistar массой 235±27 граммов с соблюдением всех норм биоэтического отношения к лабораторным животным. Протокол экспериментов утвержден на заседании комиссии по биоэтики Самарского университета. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Крысам группы А ежедневно в течение 10 суток в утреннее время внутрибрюшинно вводился раствор ЛПС *Salmonella typhi* (50 мкг/кг; ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия). Крысы группы В наряду с ЛПС получали мелатонин (0,3 мг/кг; перорально; Sigma). Крысы контрольной группы по аналогичной схеме получали инъекции 1 мл стерильного физиологического раствора. Поведение животных оценивалось в установках для исследования двигательной активности и тревожности: открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт (Openscience, Россия). В открытом поле анализировались следующие показатели: горизонтальная двигательная активность (по числу пересеченных

секторов), вертикальная двигательная активность (по числу вставаний на задние лапы), уровень тревожности (по числу актов тревожного груминга и выходов в центральный сектор). В крестообразном лабиринте фиксировалось время (с) нахождения крыс в открытых и закрытых рукавах установки, а также число горизонтальная двигательная активность по числу пересеченных секторов в открытых рукавах. Увеличение времени пребывания крыс в закрытых рукавах обозначалось как проявление высокого уровня тревожности. Производилась видеосъемка поведения крыс в тестовых установках при помощи смартфона, который крепился на специальный штатив. Поведенческие реакции крыс оценивались через 1, 3, 5 и 10 дней действия ЛПС. Полученные данные представлены как M±m.

Результаты исследования подвергались статистической обработке при помощи специализированной программы SigmaStat 12.5. Статистически значимыми считались различия при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что действие ЛПС *Salmonella typhi* оказало модулирующее влияние на поведение крыс в различных тестовых установках. В таблице 1 приведены данные о характере поведения крыс из разных групп на 10-й день наблюдения в тесте Открытое поле. Как видно из представленных данных, крысы получавшие инъекции ЛПС в меньшей степени (на 70%) проявляли двигательную активность, связанную с освоением территории теста. Обращает на себя внимание выраженное сокращение числа выходов в центральный сектор в сравнении с контрольной группой (более чем на 80%). Исследовательская активность под влиянием ЛПС снижалась в среднем на 44%.

Сочетанное воздействие ЛПС и мелатонина обеспечивало формирование более активного ориентировочно-исследовательского паттерна. Так, у крыс из группы В горизонтальная двигательная активность была в 2 раза более выраженная, чем у крыс из группы А. Под влиянием мелатонина крысы более активно совершали переходы в центральный сектор. Такой характер изменений поведения указывает на противотревожный эффект мелатонина в данных экспериментальных условиях.

Табл. 1. Влияние ЛПС *Salmonella typhi* на поведенческие реакции крыс в тесте «Открытое поле»

Показатель поведения	Контрольная группа	Группа А	Группа В
Горизонтальная двигательная активность, число актов	19,4±5,2	5,9±1,8**	12,4±2,1*#
Выходы в центральный сектор, число актов	11,1±2,4	2,2±0,4**	5,9±0,7*#
Исследовательская активность, число актов	7,8±0,9	4,7±0,3*	6,9±0,5

Примечание: * - различия показателей статистически значимы ($p<0,05$) в сравнении с контрольной группой, ** - различия показателей статистически значимы ($p<0,01$) в сравнении с контрольной группой, # - различия показателей статистически значимы ($p<0,05$) в сравнении с группой А

Заключение о противотревожном действии мелатонина подтверждаются данными о поведении крыс в приподнятом крестообразном лабиринте. Так, при действии ЛПС крысы из группы А большую часть времени предпочитали находиться в закрытых рукавах и совершали незначительные перемещения по секторам открытых рукавов. Воздействие мелатонина увеличивало в среднем 15 % ($p<0,05$) время нахождения в открытых рукавах.

Установленные в настоящем исследовании поведенческие эффекты 10-ти дневных инъекций бактериального ЛПС, по всей видимости, обеспечены с активацией иммунных процессов, выработкой провоспалительных факторов. В литературе имеются указания, что введения ЛПС является адекватным способом моделирования воспаления, в т.ч. на уровне центральной нервной системы. Первичными клетками-мишенями для ЛПС являются фагоциты, экспрессирующие связанные с мембраной CD14 и Toll-4 рецепторы [3]. Бактериальная активация фагоцитов инициирует выработку эндогенных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ФНО-альфа и др.), хемокинов (CCL2, CCL5, CXCL1), вторичных мессенджеров (NO и простагландины) и активных форм кислорода.

Образование указанных биологически активных веществ является маркерным признаком воспалительных реакций. На уровне ЦНС показана выработка провоспалительных цитокинов клетками микроглии [3, 4].

В литературе [2, 3] описаны некоторые особенности влияния провоспалительных цитокинов на активность нейронов, клеток микроглии и функционирование отдельных нейротрансмиттерных систем. Показано нарушение функциональной активности медиаторов-моноаминов в различных областях головного мозга. При этом нарушается баланс между отдельными моноаминоергическими системами и, как результат, возникают нарушения регуляции когнитивных процессов, двигательных и вегетативных функций. Повышение на уровне мозга уровней ИЛ-1-бета и ИЛ-6 ассоциируется с возникновением депрессии, тревоги и бессонницы и нарушения ночного сна [4]. Снижение выраженности «болезненного» поведения при действии мелатонина, по всей видимости, обеспечены нейротропным и иммуномодулирующим потенциалом данного регулятора [5, 6].

Выводы: 1. Воздействие ЛПС *Salmonella tiphy* вызывает ограничение двигательной и исследовательской активности и обладает протревожным эффектом. 2. Мелатонин оказывает модулирующее влияние на поведение крыс и, в целом, ограничивает проявления «болезненного поведения». 3. Поведенческие эффекты мелатонина в условиях используемой модели воспаления (введение бактериального ЛПС), вероятно, связаны с его способностью оказывать иммуномодулирующее (противовоспалительное) и нейротропное действие.

Литература

1. Voet S., Srinivasan S., Lamkanfi M., Loo G. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases // EMBO. Mol. Med. – 2019. – 11 (6): 16.
2. He J., Zhu G., Wang G., Zhang F. Oxidative Stress and Neuroinflammation Potentiate Each Other to Promote Progression of Dopamine Neurodegeneration // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020.
3. Ming, Z., Wotton, C.A., Appleton, R.T. et al. Systemic lipopolysaccharide-mediated alteration of cortical neuromodulation involves increases in monoamine oxidase-A and acetylcholinesterase activity // J. Neuroinflammation. – 2015; 12 (37): 12.

4. Максимова Н.М., Булгакова Т.Г., Узбеков М.Г. Роль цитокинов в патогенезе и терапии психических расстройств // Социальная и клиническая психиатрия. – 2019. – Т. 29, № 3. – С. 71-77.
5. Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade // J Pineal Res. – 2018; 65 (4): 12525.
6. Wongprayoon P, Govitrapong P. Melatonin Receptor as a Drug Target for Neuroprotection // Curr Mol Pharmacol. – 2021; 14 (2): 150-164.

© Наймушина Л.Д., Аисансе Манджоло Тчанг, Ив Нсала Лемба, Беляков В.И., 2022

УДК: УДК 611.813.1.061–053
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.21

ЭВОЛЮЦИЯ КОНЕЧНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© Обухов Д.К.[1]*, Пущина Е.В.[2], Цехмистренко Т.А.[3].
[1] Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург.
[2] Национальный научный центр морской биологии им. А.В.Жирмунского, г. Владивосток.
[3] Российский университет дружбы народов, г. Москва.
* dkobukhov@yandex.ru

Аннотация. Представлен краткий обзор собственных и данных других авторов по морфофункциональной эволюции конечного мозга млекопитающих животных и человека. Рассматриваются основные варианты организации конечного мозга, сложившиеся в процессе эволюции позвоночных животных. Анализ цитоархитектоники, нейронной структуры и системы связей больших полушарий мозга показал, что развитие конечного мозга в разных группах млекопитающих проходило в течении длительного времени независимыми путями. В результате сформировались четыре основных направления (типа) развития конечного мозга: консервативный, прогрессивно-консервативный, прогрессивный и консервативно-прогрессивный. Каждый из этих вариантов развития имеет как общие черты в морфофункциональной организации полушарий конечного мозга, так и специфические особенности, связанные с независимым характером адаптивной эволюции ЦНС в разных отрядах млекопитающих. Это необходимо учитывать при интерпретации данных исследований, проводимых на представителях разных отрядов современных млекопитающих.

Ключевые слова: сравнительная нейрогистология, млекопитающие, конечный мозг, эволюция,

EVOLUTION OF MAMMALIAN TELENCEPHALON

Obukhov D.K. [1], Pushchina E.V. [2], Tsekhmistrenko T.A [3].
St. Petersburg State University, Saint-Petersburg[1];
National Scientific Center of Marine Biology, Vladivostok [2],
Peoples Friendship University
of Russia[3]
*dkobukhov@yandex.ru

Abstract. A brief review of the authors' own and other authors' data on the morphofunctional evolution of the telencephalon of mammalian animals and humans is presented. The main variants organization of the telencephalon formed during the evolution of vertebrates are considered. Analysis of the cytoarchitectonics, neural structure and communication system of the cerebral hemispheres showed that the development of the telencephalon in different groups of mammals took place over a long time in independent ways. As a result, four main directions (types) of the development of the telencephalon were formed: conservative, progressive-conservative, progressive and conservative-progressive. Each of these variants of development has both common features in the morpho-functional organization of the hemispheres and specific features associated with the independent nature of the adaptive evolution of the central nervous system in different orders of mammals. This should be taken into account when interpreting the data of studies conducted on representatives of different orders of modern mammals.

Keywords: comparative neurohistology, mammals, telencephalon, evolution.

Введение

Конечный мозг (telencephalon) является важнейшим отделом головного мозга позвоночных животных и человека. По современным представлениям в процессе эволюции позвоночных конечный мозг млекопитающих развился на основе определенных структур головного мозга их рептилийных предков. Считается, что в процессе эволюции позвоночных он достигает максимального развития у приматов и человека. Однако в настоящее время доказано, что эволюция разных отрядов млекопитающих проходила независимо и, несмотря на сходство общего плана строения конечного мозга млекопитающих, его развитие в филогенезе проходило в нескольких направлениях. [5, 9, 12, 14, 17].

Полушария конечного мозга традиционно разделяют на дорсальные (паллиальные, корковые) и вентральные (субпаллиальные, подкорковые) отделы. В данном сообщении основное внимание будет уделено вопросу эволюции корковых отделов полушарий конечного мозга млекопитающих.

Общие представления о структуре и происхождении корковых структур конечного мозга млекопитающих.

Конечный мозг млекопитающих обладает наиболее сложными корковыми формациями полушарий [1,3,8]. Основы понимания структуры коры полушарий млекопитающих животных и человека были заложены в работах К. Бродмана. Он разделил кору на две основные области: гомогенетическую кору, для которой характерно шести-семислойное строение, и гетерогенетическую, где такое строение отсутствует. Каждая из этих территорий разделяется на области, а области на поля, различающиеся по строению, связям и функциональной значимости. В работах сотрудников Института мозга АМН СССР эти представления получили свое дальнейшее развитие. По классификации И.Н. Филимонова основная область коры, обозначенная им как новая кора (неокортекс) соответствует гомогенетической коре по классификации К.Бродмана. Области старой (архикортекс) и древней (палеокортекс) коры гомологичны только части гетерогенетической коры. Остальную часть коры занимает так называемая межуточная кора (мезокортекс), состоящая из периархикортекса, отделяющего новую кору от старой, и перипалеокортекса, отделяющего новую кору от древней. Таким образом новая кора имеет сложное, двойное происхождение на основе более древних структур архи- и палеокортекса, хорошо развитых у предков млекопитающих [7,9,10,14].

У млекопитающих новая кора, благодаря своему интенсивному росту, оттеснила старую и древнюю кору на медиальную и вентральную поверхность полушарий. В результате в полушариях сформировались две основные борозды: ринальная (srh), отделяющая древнюю кору от новой и гиппокампова (sh), отделяющая старую кору от новой. Эти борозды отчетливо выражены в конечном мозге всех современных млекопитающих. Далее происходило образование более мелких борозд и извилин, определяющих в дальнейшем специфическую архитектонику полушарий. По степени развития борозд и извилин конечный мозг млекопитающих разделяют на два типа: **лисэнцефалический,** для которого характерно отсутствие или очень слабое развитие борозд и извилин на поверхности полушария, и

гирэнцефалический – с более или менее развитой системой борозд и извилин [3,6,7,8].

Пути эволюционного развития конечного мозга млекопитающих.

В соответствии с имеющимися нейрогистологическими и физиологическими данными у млекопитающих в процессе их дивергентной эволюции сформировалось несколько вариантов строения конечного мозга (Рис.1).

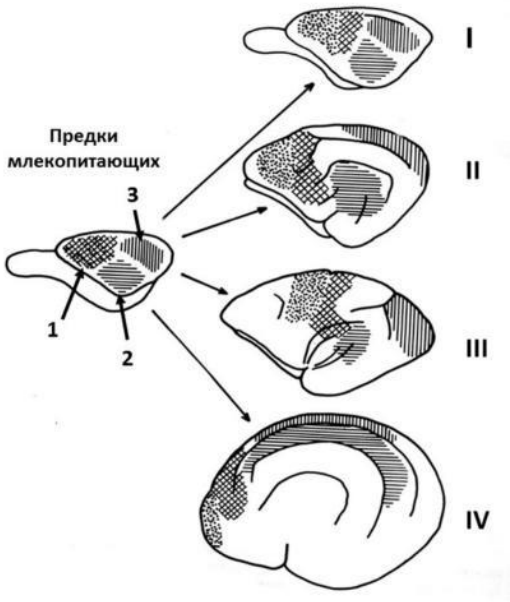


Рис. 1. Варианты организации конечного мозга млекопитающих. [1,5]. Обозначения: I-IV – варианты; 1-3 – функциональные зоны полушарий: сенсо-моторная (1), слуховая (2), зрительная (3).

Первый вариант (I) полушарий и его кортикальных структур встречается у современных представителей таких отрядов млекопитающих, как: однопроходные, сумчатые, насекомоядные, рукокрылые, грызуны, зайцеобразные и ряда других. Большинство представителей этих отрядов имеют лисэнцефалический тип строения полушарий [8,11,16,17,22]. Неокортекс у этих животных занимает от 30 до 60% поверхности полушария, хотя при этом отмечается высокая как

межотрядная, так и межвидовая изменчивость. Так, у ежового тенрека из семейства Тенрековые (полуводные насекомоядные) он занимает - 18,5% площади всей коры, а у выдровой землеройки из того же семейства – 36,7% [1,7].

Для цитоархитектоники неокортекса в полушариях первого типа характерно преимущественное развитие молекулярной пластинки (слой I) и нижнего этажа коры, включающего внутреннюю пирамидную пластинку (слой V) и мультиформную пластинку (слой VI). При этом внутренняя зернистая пластинка (слой IV) практически отсутствует (рис. X). Средняя толщина коры составляет 2-2,5 мм. Такое строение коры больше скорее напоминает структуру периархикортикального мезокортекса, подтверждая гипотезу двойного происхождения неокортекса [7,14,21]. При этом вариации толщины коры в пределах одного отряда и даже семейства могут быть очень значительными. Например, у насекомоядных ее величина может колебаться от 0,4 мм у белозубки малютки (Suncus etruscus) до 1,8 мм у выдровой землеройки (Patomogale velox) [7].

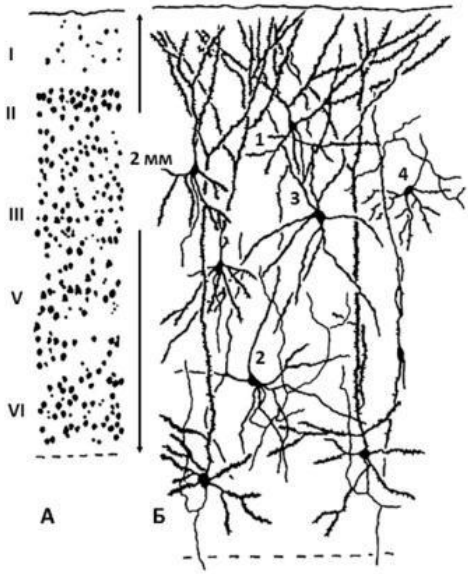


Рис. 2 Цитоархитектоника (А) и нейронная структура (Б) новой коры головного мозга летучей мыши Minopterus streibersi L. [5]. Обозначения: I-VI – слои коры, 1-4 – типы нейронов. Объяснения в тексте.

Уровень нейронной дифференцировки в новой коре полушарий первого типа достаточно низкий. Пирамидные нейроны наружной зернистой пластинки (II слой) имеют систему веерообразных дендритов, направляющихся в слой I. (Рис.2,1). Такая система ветвления дендритов характерна для примитивных низкодифференцированных нейронов и является атипичной для пирамидных нейронов в неокортексе высших млекопитающих [1,3,8]. Пирамидные нейроны нижележащих слоев отличаются большой вариабельностью по размерам и форме дендритных ветвлений. Часто встречаются так называемые "перевернутые пирамиды" (Рис.2,2). К признакам низкого уровня организации коры также относится присутствие в II-III слоях многочисленных крупных радиальных нейронов и множества переходных форм (Рис.2,3). Также в верхнем и нижнем этажах коры встречается очень мало короткоаксонных звездчатых нейронов (Рис.2,4), наличие которых является показателем высокого уровня морфофункциональной организации коры [1,3,4,8].

Что касается функциональной организации коры у животных из этих отрядов млекопитающих, то следует отметить слабое развитие ассоциативных зон, низкий уровень высшей нервной деятельности и практически полное отсутствие сложных форм условно-рефлекторной деятельности [1,2].

На структуру мозга низших млекопитающих сильное влияние оказывают адаптивные процессы, связанные с развитием ряда сенсорных систем животных. В частности, у европейского ежа (Erinaceus europaeus L.) обнаружена полисенсорная область коры, которая имеет сложный, дифференцированный нейронный состав и сравнима с ассоциативными областями коры высших млекопитающих [1,5,17].

Неравномерность эволюционных процессов проявляется даже на макроанатомическом уровне. Так, у однопроходных млекопитающих ехидны и утконоса наблюдаются существенные различия по степени гирификации коры больших полушарий. У утконоса (Ornithorhynchus anatinus) извилины практически отсутствуют, тогда как у ехидны (Tachyglossus aculeatus) можно говорить о фактически гирэнцефалическом типе полушарий. Такие же вариации наблюдаются и у сумчатых [11,22]. В целом, несмотря на большую адаптивную пластичность, такой характер эволюционного развития конечного мозга у представителей ряда отрядов современных млекопитающих можно рассматривать как достаточно **консервативный.**

Второй вариант полушарий (II) сформировался в ходе эволюции таких отрядов млекопитающих как: хищные, ластоногие, копытные, хоботные. Несмотря на имеющиеся различия в организации больших полушарий у представителей этих отрядов млекопитающих, их объединяет ряд общих черт [1,2,5,20].

Большие полушария гирэнцефалического типа имеют хорошо развитую систему крупных дуговых извилин и борозд, что существенно отличает их от других млекопитающих, например приматов. Это создает трудности при составления карт мозга и сравнении их с аналогичными картами мозга у представителей других отрядов млекопитающих. У большинства видов отсутствует истинный островок Рейли. С этим связано и почти полное отсутствие выраженной височной доли полушария.

У животных рассматриваемых отрядов новая кора занимает от 80 до 95% площади большого мозга и имеет большую толщину, варьирующую от 2,5 до 3,5 мм. [7]. Для нейроархитектоники коры, наиболее полно изученной у таких представителей хищных млекопитающих, как кошка и собака, характерно значительное увеличение разнообразия и полиморфизма нейронов. У хищных интенсивно развиваются слои III и IV, увеличивается число звездчатых короткоаксонных нейронов, уменьшается количество переходных форм, отсутствуют радиальные нейроны и атипичные формы пирамидных нейронов. В неокортексе намечается разделение на агранулярные и гранулярные поля. Помимо многочисленных первичных и вторичных проекционных полей развивается сложная система ассоциативных корковых зон, существенно увеличивается их площадь [1,2,7]. Эта особенность строения коры коррелирует с развитием сложных форм условно-рефлекторной деятельности и поведения вплоть до формирования элементов элементарной рассудочной деятельности.

Было бы естественно ожидать, что в такой обширной группе млекопитающих имеются различные уровни развития коры. Изучение зрительных полей 17 и 18 затылочной области коры мозга коровы и овцы показало, что в их структуре сохраняются многие черты, характерные для низших млекопитающих. К ним относятся: относительно слабая стратификация коры, отсутствие четких границ между цитоархитектоническими слоями (особенно между III и IV), большое количество "нетипичных" пирамидных нейронов, слабая дифференцировка звездчатых нейронов [5]. Таким образом, в рамках описываемого типа конечного мозга могут встречаться несколько его разновидностей, определяемых филогенетическими связями между

разными отрядами млекопитающих. Хотя для представителей отряда хищных и хоботных характерен достаточно высокий уровень организации корковых зон полушарий - этот вариант развития конечного мозга можно рассматривать как **прогрессивно-консервативный**.

Третий тип полушария (III) сформировался у приматов. Это один из древнейших отрядов млекопитающих и не удивительно, что именно в пределах этого отряда уровень межвидовой и межсемейственной изменчивости очень велик [13]. Так, коэффициент энцефализации у полуобезьян составляет 0,13-1,30; у низших узконосых обезьян Старого Света – 0,56-2,22; у широконосых обезьян Нового Света – 0,54-8,40; у человекообразных обезьян – 2,03-7,35; у человека – 32. Степень вариабельности в одноименных полях коры у разных представителей приматов также очень высокая [1,6,7,14].

Новая кора занимает при этом от 85 до 96% площади поверхности большого мозга. При этом происходил процесс значительной дифференциации коры. Так у ранних млекопитающих в составе коры было около 20 полей, тогда как у низших приматов выделяют уже 50 полей, а у человека – более 200 [16,17]. У приматов сформировался особый рисунок борозд и извилин в полушариях, основу которых составляют крупные первичные извилины, идущие в поперечном направлении. Примерами может служить центральная (Роландова) или шпорная борозды. Как отмечалось выше, у приматов отсутствует система дуговых извилин, за исключением латеральной борозды и борозды мозолистого тела. Хорошо развиты височная и островковая доли. Это затрудняет сравнительный анализ корковых зон приматов и других млекопитающих. Особенно это касается хищных, которых широко используют в качестве лабораторных животных.

У приматов интенсивно развиваются ассоциативные зоны коры, особенно в лобной, теменной и височной долях полушарий конечного мозга. Максимального развития они достигают у человека [2,3,8]. В конечном итоге можно рассматривать направление, в котором развивался конечный мозг приматов как - **прогрессивное**.

Четвертый особый вариант строения полушарий (IV) сформировался у китообразных. Китообразные произошли от наземных форм млекопитающих, связанных с древними копытными [15]. В дальнейшем они вторично освоили водную среду, что существенно сказалось на формировании и функционировании их ЦНС.

Конечный мозг китообразных по общему рисунку борозд и извилин отчасти напоминает мозг копытных и хищных, но значительно

отличается сильным развитием мелких борозд и извилин (микрогирия). Их также отличает резкий изгиб полушарий в теменной области (курватура) и практическое отсутствие височной доли. Индекс энцефализации у китообразных очень высок и составляет 96%, а новая кора занимает до 97-98% всей площади поверхности конечного мозга (больше, чем у высших приматов и человека) [7,8,15].

Однако анализ микроструктуры коры показал, что общий уровень организации неокортекса оказался довольно низким. Несмотря на большую площадь кора китообразных за счет небольшой толщины (1,5-2,2 мм) обладает очень малым относительным объемом - даже меньшим, чем у многих насекомоядных и грызунов. Для цитоархитектонического строения новой коры характерны большая толщина слоев I и II, четкая стратификация слоя III на подслои (в зрительной коре дельфинов Stenella coeruleoalba и Tursiops truncatus в его составе выделено три подслоя), но практически полное отсутствие слоя IV, а также интенсивное развитие филогенетически древних слоев V-VI. Отмечается слабая вариабельность цитоархитектоники разных зон коры, отсутствует разделение на гранулярную и агранулярную кору. Мелкие размеры клеток и нечеткие границы слоев придают коре мозга китообразных монотонный, пылевидный вид [7,8,18,19].

Для нейронного состава коры полушарий китообразных также характерен ряд специфических особенностей. Слои II и III содержат большое число пирамидных нейронов нетипичных, переходных форм: перевернутые пирамиды, пирамидные нейроны с веерообразными апикальными дендритами, пирамидо-веретена и т.д. Они посылают свои аксоны в белое вещество, но по ходу образуют многочисленные возвратные восходящие коллатерали, контактирующие с дендритами нейронов II-III слоев. Подобные пирамидные нейроны встречаются в конечном мозге низших млекопитающих. В численном отношении пирамидные нейроны преобладают. Помимо пирамидных нейронов в коре китообразных обнаружено большое число крупных радиальных звездчатых нейронов. Их длинные, слабоветвящиеся дендриты охватывают большую площадь, а аксонные ветвления оканчиваются на телах и дендритах нейронов нескольких слоев. Клетки такого типа относятся к разновидностям ретикулоподобных нейронов, являющихся консервативно древними формами корковых нейронов, характерными для начальных этапов эволюции нервной системы млекопитающих. Высокодифференцированных звездчатых нейронов различного типа у китообразных практически нет. [1,5,7,8,12,18,19,23]. Таламические и субкортикальные афферентные волокна, входя в кору, ветвятся дихотомически и оканчиваются во всех слоях коры, образуя

многочисленные аксо-соматические и аксо-дендритные синапсы. Наибольшая плотность контактов наблюдается в верхнем этаже коры (слои II-III), причем большая часть синаптических контактов относиться к простым, недифференцированным формам типа "et passage". Это резко отличает китообразных от других млекопитающих, у которых таламо-кортикальные волокна преимущественно оканчиваются в районе IV слоя. При этом в мозгу дельфинов обнаружена система длинных ассоциативных внутрикорковых связей и проекционных корково-спинномозговых связей, что характерно для коры приматов и человека. Китообразные имеют высокий уровень рефлекторной деятельности включая сложные формы поведения и коммуникации. При этом карта моторных и сенсорных зон в полушариях китообразных распределены особым образом, резко отличным от таковых в конечном мозге других млекопитающих (Рис. 1, IV).

Все это свидетельствует о весьма своеобразном, во многом независимом характере эволюции конечного мозга китообразных. С учетом этих данных такой путь развития ЦНС китообразных можно определить как **консервативно-прогрессивный**.

Таким образом, исследование структуры полушарий и их корковых зон у большого числа видов практически из всех основных отрядов современных млекопитающих позволило сделать ряд выводов относительно направлений эволюционного развития их конечного мозга: 1) общий, базовый план строения полушарий един для всех млекопитающих; 2) конечный мозг приматов (и человека в том числе) является только одним (хотя и самым сложным) из возможных и реализованных в эволюции типов его развития; 3) практически в каждом отряде млекопитающих встречаются виды, уровень развития мозга которых не соответствует наиболее характерному для данной группы; 4) существенные морфологические и функциональные различия в организации коры полушарий свидетельствуют о необходимости более аккуратной интерпретации данных, полученных при исследовании разных представителей млекопитающих, особенно при переносе этих данных на человека.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Богословская Л.С., Поляков Г.И. Пути морфологического прогресса нервных центров у высших позвоночных. М.: Наука. – 1981. – 181 с.

2. Карамян А.И. Эволюция конечного мозга позвоночных. Л.: Наука. 1976. 253 с.
3. Новожилова А.П., Бабминдра В.П. Кора полушарий большого мозга. // В кн.: Руководство по гистологии. Под ред. Р.К. Данилова. СПб.: Спец Лит. 2001. Т. 2. С. 542–552.
4. Обухов Д.К. Развитие идей А.А.Заварзина о строении и эволюции экранных центров ЦНС позвоночных и человека на современном этапе. // Вестник ЛГУ. 2005. Вып. 3(3). С. 52–60.
5. Обухов Д.К., Андреева Н.Г. Эволюционная морфология нервной системы позвоночных. М.: Юрайт. 2021. – 384 с.
6. Саркисов С.А., Филимонов И.Н., Кононова Е.П., Преображенская И.С. и др. Атлас цитоархитектоники коры большого мозга человека. М.: Медгиз. 1955. – 280 с.
7. Филимонов И.Н. Избранные труды. М.: Медицина, 1974. – 340 с.
8. Цехмистренко Т.А., Васильева В.А., Обухов Д.К., Шумейко Н.С. Строение и развитие коры большого мозга. М.: Спутник Плюс. 2019. – 538 с.
9. Aboitiz F, Montiel J, Lopez J. An hypothesis on the early evolution of the development of the isocortex. // Brain Res. Bull. 2002; Vol. 57. No. 3/4. Pp. 481–493.
10. Aboitiz F, Montiel J. Origin and Evolution of the Vertebrate Telencephalon, with Special Reference to the Mammalian Neocortex. // Adv. Anat. Embryol. Cell Biology. 2007. Vol. 193. Pp.115-127.
11. Ashwell K.W.S. The monotreme nervous system // In: Evolutionary neuroscience (edt. J.H.Kaas). Acad. Press. N-Y. 2020. Ch.17. Pp. 441-455. doi 10.1016/B978-0-12-820584-6-00017-9.
12. Butti C, Janeway C.M., Townshend C, Wicinski B.A., Reidenberg J.S, Ridgway S.H, Sherwood C.C, Hof P.R, Jacobs B. The neocortex of cetartiodactyls: A comparative Golgi analysis of neuronal morphology in the bottlenose dolphin (Tursiops truncatus), the minke whale (Balaenoptera acutorostrata), and the humpback whale (Megaptera novaeangliae). // Brain Struct. Funct. 2015.Vol. No.220. Pp.3339–68. doi: 10.1007/s00429-014-0860-3.
13. Fleagle J.C., Seiffert E.R. The phylogeny of primates // Evolutionary neuroscience (edt. J.H.Kaas). Acad. Press. N-Y. 2020. Ch.20. Pp. 483-518. doi /10.1016/B978-0-12-820584-6.00020-9.
14. García‐Cabezas M.Á., Hacker J. L., Zikopoulos B. Homology of neocortical areas in rats and primates based on cortical type analysis: an update of the Hypothesis on the Dual Origin of the Neocortex //Brain Structure Funct. 2022. Open Access. doi.org/10.1007/s00429-022-02548-0.

15. Cozzi B., Huggenberger S., Oelschlager H. Anatomy of dolphins. 2017. Acad Press. N-Y. 438 p.
16. Kaas J.H. The origin and evolution of neocortex: From early mammals to modern humans // Progress Brain Res. 2019 Vol. 250. Pp 61-81. doi.org/10.1016/bs.pbr.2019.03.017
17. Kaas J.H. The organization of neocortex in early mammals // In: Evolutionary neuroscience (edt. J.H.Kaas). Acad Press. N-Y., 2020. Ch.13. Pp. 333-347. doi. 10.1016/ B978-0-12-820584-6-00013-1
18. Morgane PJ, Jacobs VS, Galaburda A. Conservative features of neocortical evolution in dolphin brain. // Brain Bechav. Evolut. 1985. Vol. 26. Pp. 176–84.
19. Oelschlager H. The dolphin brain – a challenge for synthetic neurobiology. // Brain Res. Bulletin. 2008. Vol.75. Pp. 450–460.
20. Sakai S.T., Arznov B.M. Carnivoran brains effects of sociality on inter – and interspecific comparisons of regional brain volumes // In: Evolutionary neuroscience (eds. J.H.Kaas). Acad Press. N-Y., 2020. Ch.19. Pp. 463-479. doi.10.1016/B978-0-12-820584-6.00019-2.
21. Sanides F. (1970) Functional architecture of motor and sensory cortices in primates in the light of a new concept of neocortex evolution. //
In: The Primate Brain (eds. Noback C.R, Montagna W.O.) Meredith Corporation, N-Y)., 1970. Pp 137–208.
22. Santos S.E., Herculano-Houzel S. Marsupial brain are not as primitive as expected // In: Evolution of nervous system (edt. J.H.Kaas). Acad.Press. N-Y. 2017. Vol. 2. Ch.2.18. Pp. 363-380. doi 10.1016/B978-0-12-804042-3-00052-X.
23. Tartarelli G, Bisconti M. Trajectories and constraints in brain evolution in primates and cetaceans. // Human Evolution. 2006. Vol. 21 (3–4). Pp.275–287. doi: 10.1007/s11598-006-9027-007.

© Обухов Д.К., Пущина Е.В., Цехмистренко Т.А., 2022

УДК 611.813.1.061-053
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.22

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОСТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ВИСОЧНО-ТЕМЕННО-ЗАТЫЛОЧНОЙ ПОДОБЛАСТИ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА ДЕТЕЙ ОТ РОЖДЕНИЯ ДО 12 ЛЕТ

© Омар С.[1], Цехмистренко Т.А.[1,2]*, Васильева В.А.[2], Обухов Д.К.[3]
[1] Российский университет дружбы народов, г. Москва
[2] Институт возрастной физиологии Российской академии образования, г. Москва
[3] Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург
* tsekhmistrenko2010@yandex.ru

Аннотация. С помощью стереометрического анализа гистологических препаратов исследовали относительное содержание микроструктурных компонентов наружной пирамидной пластинки (III слой) в области височно-теменно-затылочной подобласти коры у детей мужского пола в возрасте от рождения до 12 лет. Материал составили 72 левых полушария, сгруппированных в годовых интервалах. Фрагменты ткани вырезали на латеральной поверхности полушария в верхнем отделе подполя 37ac в функциональной зоне hMT+, на нижнемедиальной поверхности в области подполя 37a, участвующего в опознании лица и цветовосприятии, а также на медиальной поверхности в подполе 37d, участвующего в различении эмоций. Парафиновые срезы толщиной 10 мкм импрегнировали нитратом серебра по Петерсу с докраской крезиловым фиолетовым по Нисслю. Анализ цифровых изображений препаратов проводился с помощью программы Image-Tools (NIH, USA), стереометрические данные получали при помощи 4-хузловой оптической сетки со случайным шагом. Статистическую обработку данных выполняли с применением пакета программ SigmaPlot (SYSTAT Software, USA). Установлено, что в процессе постнатального онтогенеза в слое III височно-теменно-затылочной подобласти коры большого мозга человека происходит нарастание удельного объема внутрикорковых волокон и глиоцитов, а также уменьшение относительного содержания нейронов и микрососудов. В различных зонах коры эти изменения носят регионально-специфический характер и отличаются по темпам и интенсивности, однако наиболее значимые из них

наблюдаются у детей первых двух лет жизни, а также в период от 6 до 9 лет. Предполагается, что закономерное изменение соотношения микроструктурных компонентов свидетельствует о значительной морфофункциональной перестройке и усилении надежности трофического обеспечения в районе височно-теменно-затылочной подобласти коры большого мозга с возрастом у типично развивающихся детей.

Ключевые слова: дети, микроструктура коры большого мозга, височно-теменно-затылочная подобласть, наружная пирамидная пластинка, стереометрический анализ

QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE CONTENT OF MICROSTRUCTURAL COMPONENTS IN THE TEMPORO-PARIETO-OCCIPITAL JUNCTION OF THE CEREBRAL CORTEX IN CHILDREN FROM BIRTH TO 12 YEARS OF AGE

Omar S.[1], Tsekhmistrenko T.A.[1,2], Vasilyeva V.A.[2], Obukhov D.K.[3]
[1]Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia
[2]Institute of Developmental Physiology, Russian Academy of Education, Moscow, Russia
[3]St. Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia
* tsekhmistrenko2010@yandex.ru

Abstract. Using stereometric analysis of histological preparations, we investigated the relative content of microstructural components of the external pyramidal layer (layer III) in the temporo-parieto-occipital junction in male children from birth to 12 years. The material consisted of 72 left hemispheres grouped in annual intervals. Tissue fragments were excised on the lateral surface of the hemisphere in the upper part of subfield 37ac of the cortex in the functional zone hMT+, on the lower medial surface in the area of subfield 37a involved in facial recognition and color perception, and on the medial surface in subfield 37d involved in emotion discrimination. Paraffin sections of 10 µm thickness were impregnated with silver nitrate according to Peters with Nissl cresyl violet dyeing. Digital images were analyzed using Image-Tools software (NIH, USA); stereometric data were obtained using a 4-node optical grid with a random step. Statistical data processing was performed using SigmaPlot software package (SYSTAT Software, USA). We found that during postnatal ontogenesis, an increase in the specific volume of intracortical fibers and gliocytes as well as a decrease in the relative content of neurons and

microvessels occurs in layer III of the temporal temporo-parieto-occipital junction of the human cerebral cortex. In different areas of the cortex, these changes are regionally specific and differ in pace and intensity, but the most significant of them are observed in children during the first two years of life, as well as during the period from 6 to 9 years of age. We hypothesize that the regular change in the ratio of microstructural components indicates a significant morphofunctional restructuring and increased reliability of trophic support in the temporo-parieto-occipital junction of the cerebral cortex with age in typically developing children.

Keywords: children, cortical microstructure, temporo-parieto-occipital junction, external pyramidal layer, stereometric analysis

Введение

Височно-теменно-затылочная подобласть (regio temporo-parieto-occipitalis, или TPO) является сложной заднеассоциативной областью коры большого мозга, в значительной степени вовлеченной в ряд неврологических функций высокого уровня, таких как язык, визуально-пространственное распознавание, письмо, чтение, счет, рабочая и музыкальная память, распознавание лиц и объектов и пр. [8].

TPO включает цитоархитектоническое поле 37. В его составе на латеральной поверхности заднего отдела височной доли выделяют подполе 37ac, дорсальный отдел которого представляет собой функциональную зону hMT+, играющую важную роль в визуально-моторной интеграции [12]. При его повреждении нарушается зрительно-пространственное восприятие, затрудняется слежение за движущимися объектами, а также возникает повреждение ряда когнитивных функций, включая речевую деятельность [10, 19]. На нижнемедиальной поверхности расположено подполе 37a (fusiform face area), участвующее в опознании лица и цветовосприятии [18], а на медиальной поверхности - подполе 37d, имеющее отношение к различению эмоций и реализации наглядно-действенного мышления [11, 14].

Все перечисленные корковые зоны благодаря многочисленным ассоциативным и проекционным связям встроены в сложный многоуровневый функциональный коннектом, обеспечивающий эффективную и мультимодальную интеграцию информации между различными нервными центрами [16]. Нейрон-глиальные взаимодействия, стимулирующие синаптогенез в этих сетях, а также соотношение других микроструктурных компонентов коры в наружной пирамидной пластинке в области TPO представляют значительный интерес для понимания особенностей формирования височно-теменно-

затылочной подобласти коры большого мозга на разных этапах постнатального онтогенеза, ее нейротрофического обеспечения и некоторых причин патологических отклонений [7, 15].

В связи с этим целью исследования было изучение количественных соотношений микроструктурных компонентов в наружной пирамидной пластинке ТРО для выявления особенностей ее возрастных изменений у детей от рождения до 12 лет.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили фрагменты коры большого мозга, полученные из 72 левых больших полушарий мозга лиц мужского пола в возрасте от рождения до 12 лет, погибших насильственной смертью без травм мозга. Секционный материал был собран в судебно-медицинских моргах отделов № 2 и 4 Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области. Сбор материала разрешен этической комиссией Института возрастной физиологии РАО, решение № 4 от 15 февраля 1996 года. Фрагменты ткани мозга вырезали в области подполей 37ac, 37a и 37d височно-теменно-затылочной подобласти в соответствии с Атласом цитоархитектоники коры большого мозга человека [5]. Материал был сгруппирован в годовых интервалах. Фронтальные парафиновые срезы толщиной 10 мкм окрашивали крезиловым фиолетовым по Нисслю после импрегнации нитратом серебра по Петерсу в модификации [2].

Анализ оптических изображений препаратов проводился с помощью программы Image-Tools (NIH, USA) на микроскопе Биолам-15 ЛОМО® с встроенной USB камерой UCMOS01300KPA (Altami, Россия). Объемные соотношения структурных элементов неокортекса в различных возрастных группах определяли с помощью стереометрического метода [6] в собственной модификации. При помощи встроенной в программу 4-хузловой оптической сетки со случайным шагом выявляли относительные удельные объемы (УО) нейронов, внутрикорковых волокон, кровеносных сосудов и глиоцитов в III^3 подслое коры. Всего производилось не менее 800 измерений изучаемых структурных компонентов в каждой возрастной группе при достижении критерия надежности P=95%. С целью унификации количественных данных, полученных с различных срезов, использовалась формула А.Аберкромби [1] для подсчета числа микрообъектов с учетом толщины среза. Нормальность распределения вариационных рядов проверяли с помощью критерия Колмогорова [4]. Различия между конкретными парами групп определяли методами вариационной статистики с вычислением ошибки средней,

среднеквадратического отклонения и доверительного интервала с применением двухвыборочного t-критерия Стьюдента с уровнем значимости $p \leq 0,05$ [3].

Результаты и обсуждение

Применение стереометрического анализа позволило установить, что в III^3 подслое подполя 37ас височно-теменно-затылочной коры новорожденных УО нейронов составил в среднем 24,1±1,2%, УО внутрикорковых волокон - 22,9±1,2% (рис. 1, А). Благодаря интенсивной васкуляризации неокортекса относительное содержание кровеносных сосудов в подполе 37ас новорожденных достигал 31,3±1,6% и было наибольшим по сравнению с другими микрокомпонентами в этой корковой зоне. УО глиоцитов составил в среднем 21,7±1,2% (рис. 1, Б). По мере взросления детей УО нейронов уменьшался к 6 годам в 1,2 раза, а УО волокон нарастал к 2 годам в 1,2 раза и к 6 годам в 1,6 раза по сравнению с новорожденными. Относительное содержание кровеносных сосудов уменьшалось к 2 годам в 1,3 раза, к 6 годам в 1,6 раза и к 12 годам в 2,8 раза по сравнению с новорожденными. От рождения до 8 лет наблюдалась тенденция к нарастанию содержания внутрикорковой глии, а к 9 годам ее УО значимо увеличился в 1,2 раза по сравнению с новорожденными. К 12 годам в подполе 37ас относительное содержание нейронов составило 20,0±0,8%, волокон - 39,0±1,5%, кровеносных сосудов - 11,2±0,6% и глиоцитов - 29,8±1,6%.

Таким образом, в III^3 подслое подполя 37ас относительное содержание волокон от рождения до 2 лет значимо нарастало за счет уменьшения процентного содержания кровеносных сосудов, а до 6 лет - нейронов и кровеносных сосудов. После 6 лет постепенное уменьшение УО сосудов продолжалось и сопровождалось нарастанием УО глиоцитов.

В III^3 подслое подполя 37а у новорожденных относительное содержание нейронов и волокон значимо не отличалось от их содержания в подполе 37ас и составляло соответственно в среднем 27,5±0,9% и 20,6±1,1% (рис. 2, А). Также между подполями 37ас и 37а новорожденных не было выявлено различий в содержании сосудов и глии, УО которых составлял в среднем соответственно 32,1±1,6% и 19,8±0,7% (рис. 2, Б). УО нейронов в подполе 37а уменьшался к 5 годам в 1,2 раза и к 11 годам в 1,5 раза, а УО волокон нарастал к 2 годам в 1,4 раза и к 7 годам в 1,7 раза по сравнению с новорожденными детьми. Процентное содержание сосудов уменьшалось к 2 годам в 1,3 раза, к 4 годам в 1,7 раза и к 12 годам в 2,4 раза по сравнению с

новорожденными. Как и в подполе 37ас, в подполе 37а относительное содержание глиального компонента от рождения до 12 лет постепенно нарастало, значимо увеличиваясь к 3 годам в 1,3 раза и к 8 годам в 1,5 раза по сравнению с новорожденными. К 12 годам в подполе 37а УО нейронов составило 17,6±1,6%, волокон - 38,1±2,2%, кровеносных сосудов - 13,5±1,2% и глиоцитов - 32,8±2,2%.

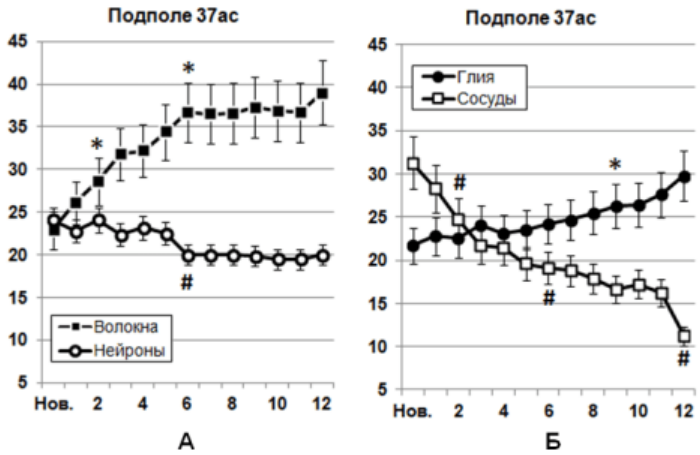


Рис. 1. Возрастные изменения удельных объемов нейронов, внутрикорковых волокон, кровеносных сосудов и глиоцитов в III[3] подслое подполя 37ас неокортекса у мальчиков от рождения 12 лет.

Здесь и на рис. 2 и 3: *по оси абсцисс* – возраст в годах, *по оси ординат* – удельные объемы в %, *вертикальные отрезки* – доверительный интервал при $p<0,05$; *,# - изменения значимы по сравнению с новорожденными или значимыми изменениями в предыдущей возрастной группе. *А* и *Б* – пояснения в тексте.

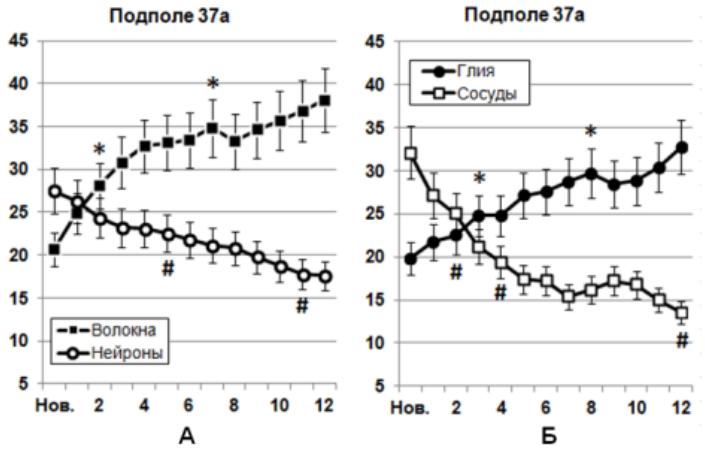


Рис. 2. Возрастные изменения удельных объемов нейронов, внутрикорковых волокон, кровеносных сосудов и глиоцитов в III^3 подслое подполя 37а неокортекса у мальчиков от рождения 12 лет.

Как следует из полученных данных, в подполе 37а, как и в подполе 37а, к 2 годам отмечалось нарастание УО волокон за счет уменьшения относительного содержания внутрикорковых волокон. От 2 до 7 лет увеличение УО волокон происходило в результате уменьшения процентного содержания нейронов и сосудов. За снижением относительного содержания сосудов следовало нарастание процентного содержания глиоцитов.

В III^3 подслое подполя 37d у новорожденных УО нейронов составлял в среднем 32,5±1,1%, что был значимо больше аналогичных показателей в подполях 37ас и 37а. Относительное содержание волокон составило в среднем 23,0±1,1% и не отличалось от УО волокон в остальных исследованных подполях (рис. 3, А). Процентное содержание кровеносных сосудов составляло 24,2±0,8% и было значимо меньше по сравнению с подполями 37ас и 37а. УО глиоцитов было таким же, как и в остальных исследованных подполях и составляло в среднем 20,3±1,4% (рис. 3, Б).

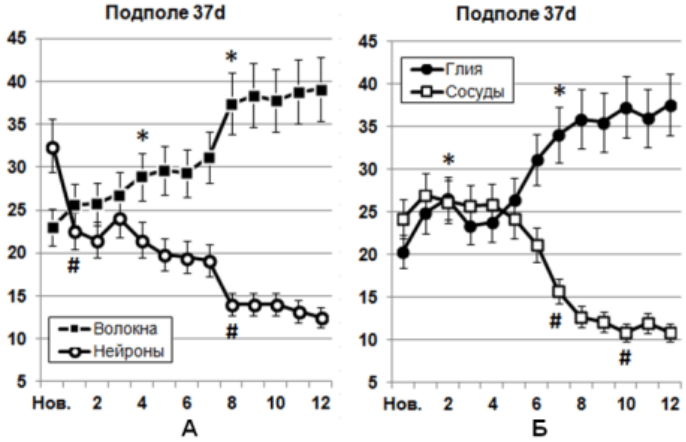


Рис. 3. Возрастные изменения удельных объемов нейронов, внутрикорковых волокон, кровеносных сосудов и глиоцитов в III[3] подслое подполя 37d неокортекса у мальчиков от рождения 12 лет.

УО нейронов в подполе 37d уменьшался к концу 1 года в 1,4 раза и к 8 годам в 2,3 раза, а УО волокон увеличивался к 4 годам в 1,3 раза и к 8 годам в 1,6 раза по сравнению с новорожденными. Относительное содержание сосудов от рождения до 5-6 лет оставалось стабильным, но к 7 годам значимо уменьшилось в 1,5 раза и к 10 годам в 2,2 раза по сравнению с новорожденными. УО глиоцитов нарастал к 2 годам в 1,3 раза и к 7 годам в 1,7 раза также по сравнению с новорожденными.

Из полученных данных следует, что в подполе 37d, в отличие от остальных исследованных подполей ТРО, в первые два года жизни происходило значимое снижение относительного содержания нейронов и нарастание содержания глии без изменений УО волокон и сосудов. Нарастание УО волокон отмечалось только к 4 годам – на 2 года позже по сравнению с остальными подполями. После 6 лет в подполе 37d, как и в других подполях ТРО, наблюдалось нарастание УО волокон и глиоцитов за счет уменьшения относительного содержания нейронов и кровеносных сосудов.

Заключение

Таким образом, в процессе постнатального онтогенеза в слое III височно-теменно-затылочной подобласти коры большого мозга человека происходит изменение относительного содержания нейронов,

волокон, микрососудов и глиоцитов. В различных подполях височно-теменно-затылочной подобласти эти изменения носят регионально-специфический характер, однако наиболее значимые из них наблюдаются у детей первых двух лет жизни, а также в период от 6 до 9 лет. Для всех исследованных корковых зон характерно нарастание удельного объема внутрикорковых волокон и уменьшение удельного объема нейронов, что по нашему мнению является надежным индикатором усложнения всего спектра внутрикорковых, межкорковых и корково-подкорковых связей височно-теменно-затылочной коры в составе специализированных распределенных нейросетей и нейроконнектома в целом, изучению которых сейчас уделяется пристальное внимание [20].

Внутрикорковое микроциркуляторное русло обладает анизотропией и пластичностью, тесно связанной с развитием нейронов [13], вследствие чего в ходе возрастных структурных преобразований коры в ней происходит уменьшение относительного содержания микрососудов и нарастание глиального компонента. По нашему мнению и мнению ряда авторов [9, 17], это свидетельствует о значительной морфофункциональной перестройке и усилении надежности трофического обеспечения в районе височно-теменно-затылочной подобласти коры большого мозга у типично развивающихся детей по мере их взросления.

Работа выполнена по Программе стратегического академического лидерства РУДН «Приоритет-2030» Министерства науки и высшего образования РФ; тема № 030209-0-000. / The study was performed under the Strategic Academic Leadership Program in RUDN University «Priority-2030» of the Ministry of Education and Science; theme № 030209-0-000.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Антонова А.М., Степанова С.Б. Модификация метода Петерса применительно к цитологическим исследованиям // Бюллетень экспериментальной биологии. 1973. Т. 75. Вып.4. – С. 122-124.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. М.: Практика, 1998. – 459 с.

4. Лемешко Б.Ю. Непараметрические критерии согласия. М.: ИНФРА-М, 2014. – 163 с.
5. Саркисов С.А., Филимонов И.Н., Кононова Е.П., Преображенская И.С. и др. Атлас цитоархитектоники коры большого мозга человека. М., Медгиз, 1955. – 280 с.
6. Стефанов С.Б., Кухаренко Н.С. Ускоренные способы количественного сравнения морфологических признаков и систем. Благовещенск: ВСХИ, 1989. – 65 с.
7. Castagno S., D'Arco F., Tahir M.Z., Battey H., Eltze C., Moeller F., Tisdall M. Seizure outcomes of large volume temporo-parieto-occipital and frontal surgery in children with drug-resistant epilepsy // Epilepsy research. 2021. Vol.177. Article 106769. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2021.106769.
8. De Benedictis A., Duffau H., Paradiso B., Grandi E., Balbi S., Granieri E., Colarusso E., Chioffi F., Marras C.E., Sarubbo S. Anatomo-functional study of the temporo-parieto-occipital region: dissection, tractographic and brain mapping evidence from a neurosurgical perspective // Journal of anatomy. 2014. Vol. 225. No 2. Pp.132–151. https://doi.org/10.1111/joa.12204.
9. Embury C.M., Wiesman A.I., Proskovec A.L., Mills M.S., Heinrichs-Graham E., Wang Y.P., Calhoun V.D., Stephen J.M., Wilson T.W. Neural dynamics of verbal working memory processing in children and adolescents // NeuroImage. 2019. Vol. 185. Pp.191–197. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.10.038.
10. Foxe D., Irish M., Roquet D., Scharfenberg A., Bradshaw N., Hodges J.R., Burrell J.R., Piguet O. Visuospatial short-term and working memory disturbance in the primary progressive aphasias: Neuroanatomical and clinical implications // Cortex. 2020. Vol.132. Pp. 223-237.https://doi.org/10.1016/j.cortex.2020.08.018.
11. Gonçalves O.F., Marques T.R., Lori N.F., Sampaio A., Branco M.C. Obsessive-compulsive disorder as a visual processing impairment // Medical hypotheses. 2010. Vol. 74. No 1. Pp.107–109. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.07.048.
12. Heinrichs-Graham E., Wiesman A.I., Embury C.M., Schantell M., Joe T.R., Eastman J.A., Wilson T.W. Differential impact of movement on the alpha and gamma dynamics serving visual processing // Journal of neurophysiology. 2022. Vol. 127. No 4. Pp.928–937. https://doi.org/10.1152/jn.00380.2021.
13. Kirst C., Skriabine S., Vieites-Prado A., Topilko T., Bertin P., Gerschenfeld G., Verny F., Topilko P., Michalski N., Tessier-Lavigne M., Renier N. Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain

Vasculature. // Cell. 2020. Vol. 180. No 4. Pp.780–795.e25. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.028
14. Klasen M., Kenworthy C.A., Mathiak K.A., Kircher T.T., Mathiak K. Supramodal representation of emotions // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. 2011. Vol. 31. No 38. Pp.13635–13643. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2833-11.2011.
15. Latini F., Fahlström M., Marklund N., Feresiadou A. White matter abnormalities in a patient with visual snow syndrome: New evidence from a diffusion tensor imaging study // European journal of neurology. 2021. Vol. 28. No 8. Pp. 2789–2793. https://doi.org/10.1111/ene.14903
16. Makris N., Zhu A., Papadimitriou G.M., Mouradian P., Ng I., Scaccianoce E., Baselli G., Baglio F., Shenton M.E., Rathi Y., Dickerson B., Yeterian E., Kubicki M. Mapping temporo-parietal and temporo-occipital cortico-cortical connections of the human middle longitudinal fascicle in subject-specific, probabilistic, and stereotaxic Talairach spaces // Brain imaging and behavior. 2017. Vol. 11. No 5. Pp.1258–1277. https://doi.org/10.1007/s11682-016-9589-3
17. Myatchin I., Lagae L. Developmental changes in visuo-spatial working memory in normally developing children: event-related potentials study // Brain & development. 2013. Vol. 35. No 9. Pp.853–864. https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.11.005.
18. Nasr S., Tootell R.B. Role of fusiform and anterior temporal cortical areas in facial recognition // NeuroImage. 2012. Vol. 63. No 3. Pp.1743–1753. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.08.031.
19. Pierrot-Deseilligny C., Gaymard B. Smooth pursuit disorders // Bailliere's clinical neurology. 1992. Vol.1, No 2. Pp. 435–454.
20. Wu Y., Sun D., Wang Y., Wang Y., Wang Y. Tracing short connections of the temporo-parieto-occipital region in the human brain using diffusion spectrum imaging and fiber dissection // Brain research. 2016. Vol. 1646. Pp.152–159. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.046.

© Омар С., Цехмистренко Т.А., Васильева В.А., Обухов Д.К., 2022

УДК: 612.2; 612.17; 57.034
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.23

СЕЗОННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА И ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ У СТУДЕНТОВ С РАЗНЫМИ ХРОНОТИПАМИ

© Павленко С.И.[1,2]*, Ведясова О.А.[1], Инюшкин А.А.[1]
[1] Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, г. Самара, Россия
[2] Медицинский университет «Реавиз», г. Самара, Россия
* pavlenko.snezhanna@mail.ru

Аннотация. Цель исследования заключалась в выявлении хронотипических особенностей дневной динамики параметров вариабельности сердечного ритма (ВСР) и внешнего дыхания у студентов в осенне-зимнем и весенне-летнем периодах учебного года.

Работа выполнена с соблюдением требований биоэтики на студентах с утренним («жаворонки»), дневным («голуби») и вечерним («совы») типами активности. Хронотипы испытуемых определяли по методике Д. Хорна – О. Остберга в модификации А.А. Путилова. Параметры ВСР регистрировали с помощью пульсоксиметра «ЭЛОКС-01М», а внешнее дыхание с использованием спирографа КМ-АР-01-«Диамант» в осенне-зимние и весенне-летние месяцы учебного года. В ходе исследования выявлены хронотипические различия параметров ВСР и паттерна внешнего дыхания у студентов «жаворонков», «голубей» и «сов» в осенне-зимнем и весенне-летнем периодах учебного года. Наиболее выраженная сезонная динамика изучаемых показателей отмечались у студентов «жаворонков» и «голубей», а наименьшая − у «сов». Так, у «жаворонков» наблюдался рост значений отдельных параметров ВСР в весенне-летнем периоде относительно осенне-зимнего. У «голубей» отмечалось увеличение диагностических и снижение спектральных параметров ВСР к весенне-летнему периоду. У студентов «сов» сезонные изменения затрагивали только спектральные параметры ВСР. Что касается паттерна внешнего дыхания, то значения ряда его объемных и временных параметров у студентов «жаворонков» и «голубей» в весенне-летнем периоде были ниже, чем в осенне-зимнем. Сезонные вариации параметров паттерна внешнего дыхания у «сов» не имели закономерного характера. Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что динамика параметров ВСР и внешнего

дыхания у студентов в течение учебного года зависит от их циркадианных ритмов.

Ключевые слова: вариабельность сердечного ритма; внешнее дыхание; хронотипы; сезоны года.

SEASONSDEPENDENCE OF HEART RATE VARIABILITY AND EXTERNAL RESPIRATION IN STUDENTS WITH DIFFERENT CHRONOTYPES

Pavlenko S.I. [1,2]*, Vedyasova O.A.[1], Inyushkin A.A.[1]
[1]Samara National Research University, Samara
[2]Samara Medical Institute Reaviz, Samara
* pavlenko.snezhanna@mail.ru

Abstract. The aim of the study was to identify the chronotypical features of the daily dynamics of heart rate variability (HRV) and external respiration parameters among students in the autumn-winter and spring-summer periods of the academic year.

The study was performed in compliance with the requirements of bioethics on students with morning («larks»), daytime («pigeons») and evening («owls») types of activity. The chronotypes of the subjects were determined by the method of D. Horn – O. Ostberg in the modification of A.A. Putilov and questionnaires of O.N. Moskovchenko. HRV parameters were recorded using the pulse oximeter «ELOKS-01M», and external respiration was recorded using the spirograph KM-AR-01-«Diamant» in the autumn-winter and spring-summer months of the academic year. The study revealed chronotypic differences in HRV parameters and the pattern of external respiration among students of «larks», «pigeons» and «owls» in the autumn-winter and spring-summer periods of the academic year.The most pronounced changes in the seasonal dynamics of the studied indicators were observed in the students of «larks» and «pigeons», and the least noticeable – among «owls». Thus, in «larks» an increase in the values of some HRV indicators in the spring-summer period in relation to the autumn-winter period was revealed.The «pigeons» showed an increase in diagnostic and a decrease in the spectral parameters of HRV by the spring-summer period. For students «owls» seasonal changes affected only the spectral parameter of HRV.As for the pattern of external respiration, the values of a number of its volumetric and temporal indicators in the students of «larks» and «pigeons» in the spring-summer period were lower than in the autumn-winter period. Seasonal variations in the parameters of the pattern of external respiration among students «owls» did not have a regular

character. The data obtained in the work indicate that the dynamics of HRV and external respiration parameters in students during the academic year depends on their circadian rhythms.

Keywords: heart rate variability; external respiration; chronotypes; seasons of the year.

Введение

В настоящее время актуальной медико-биологической проблемой является сохранение функциональных резервов и адаптационного потенциала учащихся, в т. ч. студентов, в условиях периодических вариаций биологических и поведенческих паттернов [1, 2]. Характерное для школьников и студентов несовпадение режимов труда и отдыха, в частности расписания аудиторных занятий, с циркадианными ритмами физиологических процессов [3] может вызывать напряжение функционального состояния организма, стрессы, а также приводить к десинхронозам и, как следствие, к ухудшению здоровья [2, 4]. При этом высокой чувствительностью к дезинхронозам отличаются сердечно-сосудистая и дыхательная системы, деятельность которых тесно связана с 24-часовым циркадианным циклом [5, 6]. Следует отметить, что циркадианные колебания сердечного ритма и параметров дыхания исследованы достаточно широко [5, 6, 7]. Что касается сезонных колебаний параметров дыхания и кровообращения у человека в разных условиях жизнедеятельности, то данный аспект изучен недостаточно полно [8–10] и, в частности, практически не разработан вопрос о сезонных различиях указанных функций у представителей с утренним, дневным и вечерним типами активности.

С учетом этого была определена цель настоящего исследования, которая состояла в выявлении хронотипических особенностей дневной динамики параметров вариабельности сердечного ритма (ВСР) и внешнего дыхания у студентов в осенне-зимнем и весенне-летнем периодах учебного года.

Материалы и методы

Исследование выполнено на студентах 2-5 курсов Самарского университета. Каждый испытуемый представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения характера предстоящего исследования. На всех этапах работы соблюдались требования биоэтики к проведению физиологических исследований на человеке.

Хронотипы испытуемых определяли с помощью теста Д. Хорна – О. Остберга в модификации А.А. Путилова. По итогам тестирования

были сформированы группы участников с утренним («жаворонки», 56 чел.), дневным («голуби», 100 чел.) и вечерним («совы», 104 чел.) типами активности. С целью выявления сезонных колебаний параметров ВСР и дыхания у разных хронотипов обследование студентов проводили в осенне-зимние (1 семестр учебного года) и весенне-летние(2 семестр учебного года) месяцы. ВРС регистрировали с помощью пульсоксиметра «ЭЛОКС-01М» (Россия), при этом анализировали частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), индексы активности симпатического (СИМ, усл. ед.) и парасимпатического (ПАР, усл. ед.) отделов вегетативной нервной системы, индекс напряжения Баевского (ИБ, усл. ед.), мощность спектра ВСР в диапазоне высоких частот (HF, мс^2), в низкочастотном (LF, мс^2) и сверхнизкочастотном (VLF, мс^2) диапазонах, суммарную спектральную мощность ВРС (TP, мс^2).Для регистрации внешнего дыхания использовали компьютерный спирограф КМ-АР-01-«Диамант» (Россия). Оценивали следующие параметры спирограммы: минутный объем дыхания (МОД, л/мин), дыхательный объем (ДО, л), частоту дыхания (ЧД, цикл/мин), длительность вдоха (Твд, с) и выдоха (Твыд, с), длительность дыхательного цикла (Тц, с), объемную скорость инспираторного потока (Vi, л/сек).

В ходе статистического анализа экспериментальных данных применяли тесты Шапиро–Уилка, парный t-тест (при нормальном распределении данных) и ранговый тест Уилкоксона (в случае несоответствия распределения данных в выборках нормальному). Полученные результаты представляли как средние арифметические ± стандартные ошибки среднего (M ± SEM) и как медианы (Me) с межквартильным размахом (P25 – P75). Изменения исследуемых параметров считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования установлено наличие сезонных особенностей ВСР и паттерна внешнего дыхания у студентов, при этом показано, что как в осенне-зимний, так и в весенне-летний периоды учебного года изучаемые показатели зависели от хронотипа испытуемых.

Согласно полученным данным, сезонная динамика ВСР с большей выраженностью проявлялась у студентов «голубей». Как правило, исходные значения ряда параметров ВСР в осенне-зимние месяцы были у них выше, чем в весенне-летние. В отношении отдельных индексов эта разница чаще отмечалась в дневное время суток. Например, для «голубей» был характерен рост значений СИМ от

1 (1 – 3) усл. ед. осенью/зимой до 2,3 (1 – 4,8) усл. ед. весной/летом (рис. 1 А). ИБ у этих студентов демонстрировал сходную динамику и в конце весеннего семестра учебного года возрастал до 78 (50,3 – 152,3) усл. ед., что было на 29,4% больше, чем в осеннем семестре. Уровень ПАР у «голубей» (рис. 1 Б), напротив, преобладал осенью/зимой, составляя в среднем 16 (12,5 – 21) усл. ед., а к весенне-летним месяцам уменьшался до 14 (10,3 – 16) усл. ед. ($p<0,01$). Что касается спектральных параметров ВСР, то у данного хронотипа отмечалось снижение к концу учебного года показателя TP от 9249,51 мс^{2}до 7129,61 мс^2. LF- и HF-компоненты спектра в весенне-летний сезон также уменьшались в сравнении осенне-зимними месяцами в среднем на 32,9% ($p<0,05$).

У «жаворонков» межсезонные различия ВСР касались уровня ПАР и ЧСС. Осенью/зимой ПАР составлял у них 13 (9 – 16) усл. ед., весной/летом – 10,5 (7 – 14,8) усл. ед. (рис. 1 Б). Наибольшие значения ЧСС наблюдались весной-летом и при этом были в среднем на 4,6 уд/мин выше, чем осенью-зимой.

У студентов «сов» сезонные различия ВСР наблюдались только в спектральных параметрах. В частности, в осенне-зимнем сезоне в дневное время суток мощность LF волн составляла у них 3280 (2034 – 4849) мс^2, в весенне-летнем уменьшалась до 2451 (1517,5 – 3646) мс^2. Мощность волн HF-диапазона в осенне-зимнем периоде была больше, чем весной/летом на 1030 (532 – 1998,5) мс^2, причем эта сезонная разница чаще отмечалась в вечернее время суток. Следует подчеркнуть, что подобная сезонная динамика спектральных показателей ВСР проявлялась у дневного хронотипа. С учетом литературных данных [10] наблюдаемые изменения HF- и LF-компонентов спектра можно рассматривать как свидетельство вклада в регуляцию сердца как парасимпатических, так и симпатических влияний при адаптации к смене сезонов года.

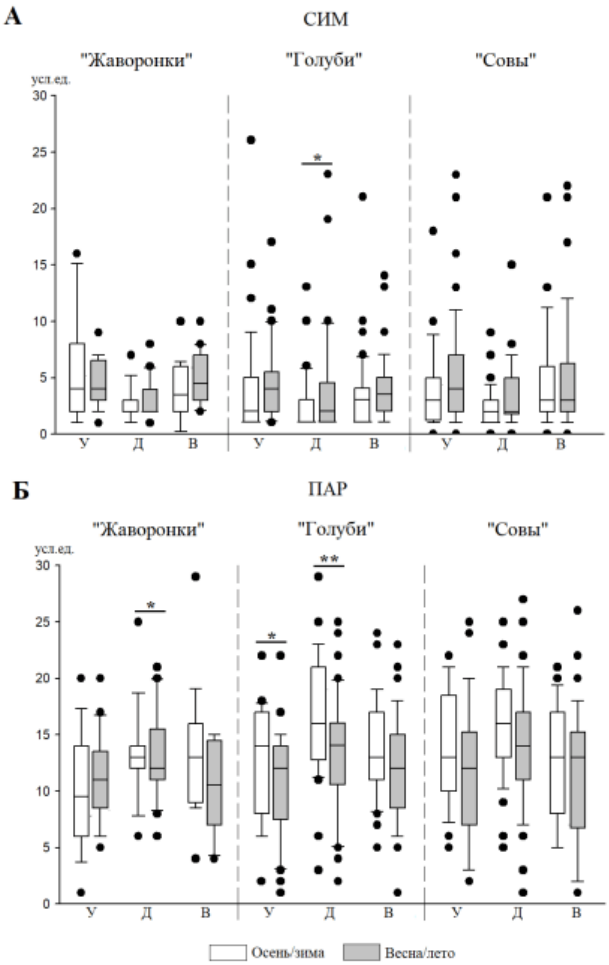


Рис. 1. Дневная динамика значений показателей СИМ (А) и ПАР (Б) у студентов «жаворонков», «голубей» и «сов» в осенне-зимнем и весенне-летнем периодах учебного года. На боксах представлены Me (P25 – P75) и выбросы. Обозначения: У – утро, Д – день, В – вечер; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (тест Уилкоксона).

В целом, результаты анализа ВСР позволяют говорить о сезонных различиях активности вегетативных механизмов регуляции

сердечного ритма у лиц с разными хронотипами. При этом обращает внимание отсутствие у испытуемых закономерной динамики ЧСС в интервале осень-лето, что согласуется с результатами других исследований [8].

Одновременно у представителей всех хронотипов были выявлены некоторые сезонные особенности показателей паттерна внешнего дыхания, которые наиболее выражено проявлялись у студентов «жаворонков» и «голубей».

Характерно, что у «жаворонков» межсезонные различия параметров спирограммы выявлялись в утренние и вечерние часы. Так, в весенне-летние месяцы утренние значения МОД и ЧД были у них на 21,8% и 15,3% ($p<0,05$) ниже, чем в осенне-зимние(рис. 2 А, Б). Следует заметить, что отмеченное во втором семестре учебного года снижение ЧД совпадало с увеличением времени выдоха и общей продолжительности дыхательного цикла относительно осенних показателей на 22,9% и 19,1% ($p<0,05$)соответственно. Сезонные особенности дыхания, регистрируемые у «жаворонков» в утренние время, обусловлены, вероятно, выбросом в кровь кортизола, который приурочену них к более раннему времени суток, чем у других хронотипов. Согласно литературным данным [11], «жаворонкам» свойственны в целом более высокое содержание кортизола и его более значительные суточные вариации, чем, например, вечернему хронотипу.

У «голубей» сезонные различия параметров паттерна внешнего дыхания отмечались в дневное и вечернее время суток. Такой интегральный показатель спирограммы как МОД у «голубей» в осенне-зимний сезон в указанные часы был выше соответственно на 20,8% ($p<0,01$) и 18,3% ($p<0,05$), чем в весенне-летний период(рис. 2 А). ЧД у этих студентов осенью и зимой также превышала весенние значения(рис. 2 Б), причем это обусловливалось главным образом изменениями фазы вдоха (Твд уменьшалась от 1,88 ± 0,09 с весной до 1,64 ± 0,07 с осенью, т.е. на 12,8%; $p<0,05$). Наряду с этим, в осенне-зимнем сезоне также отмечалось увеличение дневного значения Vi на 18,2% ($p<0,05$) по сравнению с весенне-летними месяцами. Выявленная у «голубей» приуроченность сезонных различий показателей дыхания к дневному времен суток, с одной стороны, соответствует их биоритмологическому типу, а с другой, отражает более высокий уровень активности механизмов регуляции дыхания в осенне-зимних месяцах года.

Наименьшую изменчивость функции дыхания в течение учебного года проявили студенты «совы», у которых не было выявлено

существенной сезонной динамики спирографических показателей. Возможным объяснением этого является высокий порог возбудимости, отмечаемый у представителей вечернего типа [12], и, таким образом, меньшая их чувствительность к факторам, включая климатические изменения, сопровождающим смену сезонов года.

В плане понимания сезонных различий параметров дыхания представляют интерес исследования, в которых был выявлен рост МОД в осенний [13] и зимний [14] периоды, трактуемый авторами как результат повышения возбудимости дыхательного центра на фоне низких температур внешней среды. Например, исследователи отмечали, что при физической нагрузке увеличение МОД осенью/зимой и его снижение весной/летом связаны с колебаниями ДО [13, 14]. Что касается обследованных нами студентов, выполнявших учебную деятельность в условиях относительного физического покоя, то у них сезонная динамика МОД обеспечивалась преимущественно изменениями ритмики дыхания, на что указывают различия ЧД в разные семестры учебного года, особенно заметные у «жаворонков» и «голубей». Это позволяет говорить о циркадианной типологии сезонных колебаний внешнего дыхания.

Таким образом, выявленная у испытуемых сезонная динамика ВСР и внешнего дыхания характеризуется определенной циркадианной модуляцией, о чем можно судить по значениям показателей изучаемых функций у лиц с утренним, дневным и вечерним хронотипами. Обнаруженные сезонные различия более заметны у «голубей» и слабее у «жаворонков» и «сов».

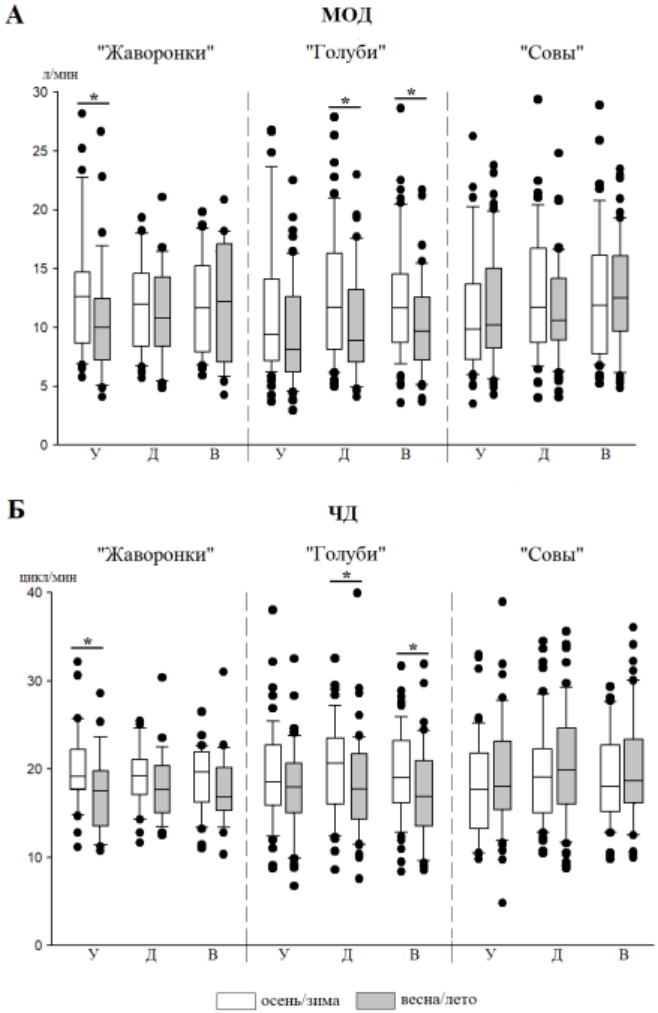


Рис. 2. Дневная динамика значений МОД (А) и ЧД (Б) у студентов «жаворонков», «голубей» и «сов» в осенне-зимнем и весенне-летнем периодах учебного года. На боксах представлены Me (P25 – P75) и выбросы. Обозначения: У – утро, Д – день, В – вечер; * – $p < 0,05$ (тест Уилкоксона).

В качестве основного фактора, определяющего наблюдаемые вариации ВСР и дыхания, следует назвать изменение активности

супрахиазматического ядра, которое является ведущим генератором циркадианных ритмов физиологических функций [15]. За счет информации, поступающей в супрахиазматическое ядро при колебаниях уровня освещенности и длительности световых периодов [16, 17], его нейроны влияют на молекулярные механизмы периферических пейсмекеров и синхронизируют процессы в органах и тканях посредством различных сигнальных путей. Важнейшими сигнальными молекулами при этом являются мелатонин и кортизол [2, 18], секреция которых характеризуется циркадианными паттернами и определяет уровень бодрствования и интенсивность физиологических функций. Исходя из того, что параметры световых раздражителей в течение года меняются и существенно различаются в осенне-зимний и весенне-летний периоды, можно считать, что сезонные различия колебаний функций организма, в том числе кровообращения и дыхания, связаны с сезонными вариациями циркадианного профиля выработки указанных гормонов.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-4515.2022.2.

Исследование проведено в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева (Самара).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Adan A., Natale V. Gender differences in morningness-eveningness preference // Chronobiol. Int. 2002. Vol.19. № 4. P. 709–720.
2. Ba-Ali S., Brondsted A.E., Andersen H.U., Sander B., Jennum P.J., Lund-Andersen H. Assessment of diurnal melatonin, cortisol, activity, and sleep-wake cycle in patients with and without diabetic retinopathy // SleepMed. 2019. Vol. 54. P. 35–42.
3. Koscec A., Radosevic-Vidacek B., Bakotic M. Morningness–eveningness and sleep patterns of adolescents attending school in two rotating shifts //Chronobiol. Int. 2013. Vol. 31. № 1. P. 52–63.
4. Датиева Ф.С., Беляева В.А., Такоева Е.А., Нартикоева М.И. Оценка показателей Мюнхенского опросника хронотипа у студентов-медиков

// Современные вопросы биомедицины. 2021. Т. 5. № 2. DOI: 10.51871/2588-0500_2021_05_02_5.
5. Селиверстова Г.П., Куницкая С.В. Индивидуальные хронотипы работоспособности и циркадианные ритмы функциональной активности системы кровообращения учащихся в аспекте гендера // Ученые записки университета им. П.Ф. Лесгафта. 2011. Т. 74. № 4. – С. 162–166.
6. Roeser K., Obergfell F., Meule A., Vögele C., Schlarb A.A., Kübler A. Of larks and hearts-morningness/eveningness, heart rate variability and cardiovascular stress response at different times of day // Physiol. Behav. 2012.Vol. 106. № 2. P. 151–157.
7. Pavlenko S.I., Vedyasova O.A., Kretova I.G. Correlations between the external respiration indicators and the heart rate variability in students of different chronotypes during their mental activities // Human Physiology. 2021. Vol. 47. Issue 2. P. 158-167.
8. Беляева В.А. Сезонная и суточная динамика обращаемости населения г. Владикавказа с гипертоническими кризами за скорой медицинской помощью // Медицинский альманах. 2017. Вып. 2. – С. 23–26.
9. Гудков А.Б., Мануйлов И.В., Торшин В.И., Попова О.Н., Лукманова Н.Б. Сезонные изменения параметров внешнего дыхания у лыжников массовых спортивных разрядов в условиях Европейского Севера // Экология человека. 2016. № 7. – С. 31–36.
10. Ботоева Н.К., Урумова Л.Т. Цирканнуальные колебания вариабельности сердечного ритма у студентов-медиков, жителей предгорной территории Северной Осетии // Фундаментальные исследования. 2012. № 12-2. С. 228–233.
11. Oginska H., Fafrowicz M, Golonka K, Marek T, Mojsa-Kaja J, Tucholska K. Chronotype, sleep loss, and diurnal pattern of salivary cortisol in a simulated daylong driving // Chronobiol. Int. 2010. Vol. 27. №5. P. 959–974.
12. Rahafar A., Maghsudloo M., Farhangnia S., Vollmer C., Randler C. The role of chronotype, gender, test anxiety, and conscientiousness in academic achievement of high school students// Chronobiol. Int. 2016. Vol. 33. № 1. – P. 1–9.
13. Завьялова А.А., Щербина Ф.А., Смолина В.С. Сезонные изменения показателей внешнего дыхания у детей среднего школьного возраста – уроженцев г. Архангельска // Экология человека. 2012. Т. 2. – С. 28–31.
14. Копытова Н.С., Гудков А.Б. Сезонные изменения функционального состояния системы внешнего дыхания у жителей европейского Севера России // Экология человека. 2007. Т. 10. – С. 41–43.

15. Арушанян Э.Б., Попов А.В. Современные представления о роли супрахиазматических ядер гипоталамуса в организации суточного периодизма физиологических функций // Успехи физиологических наук. 2011. Т. 42. № 4. – С. 39–58.
16. McGlashan E.M., Poudel G.R., Vidafar P., Drummond S.P.A., Cain S.W. Imaging individual differences in the response of the human suprachiasmatic area to light // Front. Neurol. 2018. Vol. 9.№ 1022. DOI: 10.3389/fneur.2018.01022.
17. Farajnia S., van Westering T.L., Meijer J.H., Michel S. Seasonal induction of GABAergic excitation in the central mammalian clock // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. Vol. 111. P. 9627–9632.
18. Aubin S., Kupers R., Ptito M., Jennum P. Melatonin and cortisol profiles in the absence of light perception // Behav. Brain Res. 2017.Vol. 317. P. 515–521.

© Павленко С.И., Ведясова О.А., Инюшкин А.А., 2022

УДК: 611.835.8
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.24

IBA-1-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ В СЕДАЛИЩНОМ НЕРВЕ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

© Петрова Е.С.*, Колос Е.А.
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
iempes@yandex.ru

Аннотация. Цель настоящей работы состояла в исследовании распределения популяции макрофагов, экспрессирующих белок Iba-1, в седалищном нерве крысы в разные сроки после травмы. Проведено иммуногистохимическое исследование Iba-1^{+} макрофагов в эндоневрии нервного ствола седалищного нерва крысы после наложения лигатуры. Описана динамика изменения количества иммунореактивных структур в разные сроки после травмы. Выявлено значительное увеличение макрофагов через 7 сут после операции. Результаты работы предполагается использовать в дальнейших исследованиях по поиску новых способов стимуляции поврежденных нервов с применением клеточной терапии.

Ключевые слова: нерв, регенерация, белок Iba-1, макрофаги.

IBA-1-IMMUNOPOSITIVE CELLS IN THE SCIATIC NERVE OF RATS IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Petrova E.S.*, Kolos E.A.
Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg
iempes@yandex.ru

Abstract. The purpose of this work was to study macrophages expressing the Iba-1 protein in the sciatic nerve of rats at different times after injury. An immunohistochemical study of Iba-1^{+} macrophages in the rat sciatic nerve endoneurium after ligation was performed. The dynamics of changes in the number of immunoreactive structures at different times after injury is described. A significant increase in macrophages was revealed 7 days after the operation. The results of the work will be used in further research to find new ways to stimulate damaged nerves using cell therapy.

Keywords: nerve, regeneration, Iba-1 protein, macrophages

Введение

Актуальность исследования механизмов регенерации поврежденных нервных проводников связана с частотой травм нервных стволов, а также невозможностью порой их полного функционального восстановления при применении традиционных хирургических способов лечения. После травмы нерва в его дистальном сегменте наблюдается валлеровская дегенерация (ВД), включающая в себя распад нервных волокон, их демиелинизацию, миграцию гематогенных макрофагов, дедифференцировку шванновских клеток и ряд других сложных структурных изменений [1-3]. Практически одновременно из проксимального отдела начинается рост на периферию регенерирующих аксонов. Известно, что большое значение для осуществления регенерации имеют макрофаги. Резидентные и гематогенные макрофаги принимают участие в уборке продуктов распада миелина, а также создают необходимое микроокружение, вырабатывая биологически активные вещества, влияющие на другие клетки нерва. Каскад событий, развивающихся в дистальном сегменте поврежденного нерва, достаточно сложен, многие вопросы, касающиеся взаимодействия клеток эндоневрия и их регуляции, до сих пор остаются малоизученными [3]. Цель настоящей работы состояла в исследовании распределения популяции макрофагов, экспрессирующих белок Iba-1, в седалищном нерве крысы в разные сроки после травмы.

Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах линии Вистар-Киото массой 200-250 г (n = 16). При работе с животными руководствовались международными правилами Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными. У крыс под эфирным наркозом на уровне верхней трети бедра после эпиляции делали разрез кожи длиной 15 мм, рассекали подлежащие мышцы для подхода к седалищному нерву. Нерв повреждали путем лигирования в течение 40 с, затем накладывали швы на рассеченные мышцы и кожу. Через 1, 7 и 21 сут после операции крыс выводили из эксперимента путем передозировки наркоза и выделяли фрагменты седалищных нервов в области повреждения. Материал фиксировали с течение 1 сут в растворе цинк-этанол-формальдегида [4]. После соответствующей

гистологической обработки материал заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме фирмы Pfm Rotary 3003 (PFM, Германия). Для идентификации макрофагов на парафиновых срезах проводили иммуногистохимическую реакцию на белок Iba-1. Использовали поликлональные козьи антитела к антигену Iba-1 (разведение 1:200, AbCam, Великобритания). При выявлении комплекса антиген-антитело применяли вторичные антикозьи биотинилированные антитела и стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой, из набора Anti-Goat HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit (R&D Systems, США). Гистологические препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия) и цифровой фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Измерение площади, занятой Iba-1^{+} структурами осуществляли на срезах через дистальный сегмент нерва, используя программу ImageJ (NIH, США). Различия определяли по t-критерию при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Гистологический анализ поперечных срезов седалищного нерва показал, что в интактном нерве крысы структуры, содержащие белок Iba-1, встречаются в соединительнотканных оболочках нерва, в эндоневрии они представлены в незначительном количестве. Это единичные резидентные макрофаги, экспрессирующие Iba-1. Они присутствуют в эндоневрии среди нервных волокон, нейролеммоцитов, фибробластов и других клеточных элементов. Резидентные макрофаги отличаются от макрофагов гематогенного происхождения. Они заселяют нервы в пренатальный период развития и сохраняют способность к пролиферации. Они выполняют важную функцию - участвуют в процессе фагоцитоза продуктов распада миелина в первые сутки после повреждения нерва, до миграции в нерв гематогенных моноцитов/макрофагов [5].

Через 1 сут после повреждения число Iba-1 содержащих макрофагов достоверно не изменяется. Через 7 сут после наложения лигатуры в дистальном сегменте нерва резко увеличивается количество макрофагов (рис. 1б). Этот срок соответствует развитию в дистальном сегменте поврежденного нерва валлеровской дегенерации. Установлено, что в эндоневрии через 7 сут после операции наблюдается наибольший процент площади среза нервного ствола, содержащей белок Iba-1 (5,0±0,5%). Это приблизительно в 2 раза больше ($p<0,05$), чем через 21 сут после операции (рис.1а).

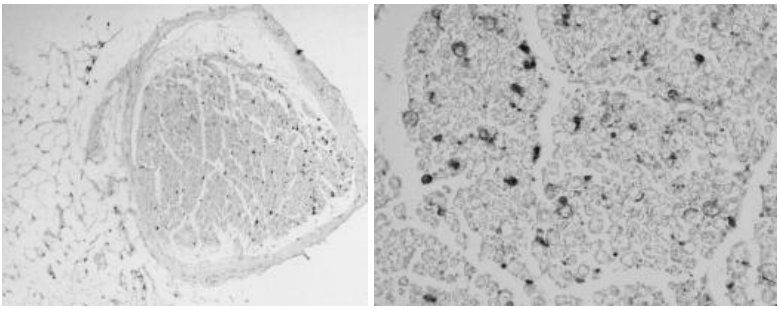


Рис. 1. Общий вид нервного ствола седалищного нерва крысы через 21 сут (а) и фрагмент эндоневрия через 7 сут (б) после наложения лигатуры. Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1. Ув.: х100 (а); х400 (б)

В настоящем исследовании для идентификации макрофагов применяли иммуногистохимическое выявление кальций-связывающего белка Iba-1, который является маркером фагоцитирующих клеток [6]. Он экспрессируется в клетках микроглии/макрофагов центральной и периферической нервной системы [6, 7]. В настоящей работе выявлен пик макрофагов через 7 сут после операции. Это наблюдение подтверждает известный факт повышения числа гематогенных макрофагов, которые участвуют в процессах ВД после повреждения нерва. По данным классических методов гистологии и электронной микроскопии их миграция в поврежденный нерв начинается через 3-4 сут и значительно увеличивается через неделю [1].

Применение методов иммуногистохимии на парафиновых срезах позволяет селективно выявлять специфические для клеточных структур (в частности, макрофагов) белки и получать результаты быстрее, чем при использовании классических импрегнационных методов или электронной микроскопии. Отработанный метод выявления макрофагов в поврежденном нерве удобен не только при проведении экспериментальных исследований, но и для диагностических целей.

Таким образом, в настоящей работе описана динамика изменения в эндоневрии седалищного нерва крысы Iba-1^{+} структур после травмы. С помощью иммуногистохимического метода показано, что пик миграции гематогенных макрофагов в дистальном сегменте нерва наступает через 7 сут после наложения лигатуры, что

соответствует ранее полученным классическими методами данным. Результаты работы предполагается использовать в дальнейших исследованиях по поиску новых способов стимуляции поврежденных нервов с применением клеточной терапии.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Исследование было рассмотрено и одобрено этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (протокол № 3/19 от 21.04.2019).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И. Периферическая нервная система. СПб.: Наука, 1999.
2. Koeppen A.H. Wallerian degeneration: history and clinical significance // Journal of the Neurological Sciences. 2004. Vol. 220. P.115-117.
3. Kerns J.M., Walter J.S., Patetta M.J., Sood A., Hussain A.K., Chung J.J., Deshpande A., DesLaurier J.T., Dieter R.A., Siemionow M., Seiler F.A., Amirouche F.M.L., Gonzalez M.H. Histological Assessment of Wallerian Degeneration of the Rat Tibial Nerve Following Crush and Transection Injuries // J Reconstr Microsurg. 2021. Vol. 37. No 5. P.391-404.
4. Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review) // Modern Technologies in Medicine. 2018. Vol. 10. No 2. C. 156-165.
5. Kolter J., Kierdorf K., Henneke P. Origin and Differentiation of Nerve-Associated Macrophages // J. Immunol. 2020. Vol. 204. No 2. P.271-279.
6. Kolos E.A., Korzhevskii D.E. Spinal cord microglia in health and disease // Acta Naturae. 2020. Vol.12. No 1. P. 4-17.
7. Ohsawa K., Imai Y., Kanazawa H., Sasaki Y., Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia // J. Cell Sci. 2000. Vol. 113. No 17. P. 3073–3084.

© Петрова Е.С., Колос Е.А., 2022

УДК 591.3:591.481:597.5
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.25

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОГЕНЕЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ МЕЗЕНЦЕНЦЕФАЛОНА МОЛОДИ ТИХООКЕАНСКОЙ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA*

© Пущина Е.В.[1]*, Капустянов И.А.[1], Стуканева М.Е.[1], Вараксин А.А.[1], Обухов Д.К.[2]
[1]Национальный Научный Центр Морской биологии ДВО РАН, г. Владивосток
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург
*puschina@mail.ru

В отличие от млекопитающих, нейральные стволовые клетки рыб после травмы способны к нейрогенезу. Сигнальная среда нейральных стволовых клеток сильно изменена наличием поврежденных клеток и притоком иммунных, а также других клеток. В настоящей работе представлены результаты собственных исследований, связанные с обнаружением новых нейрогенных зон у молоди кеты за пределами конечного мозга, в частности в области каудального мезенцефалона и мозжечке после долговременной травмы. Также представлена попытка обобщения текущих представлений о развитии, физиологических и иммунных сигналах, которые действуют на нейральные стволовые клетки в центральной нервной системе, прямо или опосредованно модулируя их нейрогенное состояние. Эти сигналы действуют на определенные внутриклеточные пути, измененяя структуру хроматина и экспрессию некоторых регуляторных генов, что в конечном итоге приводит к регенеративному нейрогенезу. Трансляционные подходы в работах по нейрогенезу у млекопитающих с ограниченным регенеративным потенциалом показали, что стволовые клетки центральной нервной системы могут быть перепрограммированы для нейрогенеза. У рыб в отличие от млекопитающих, нервные стволовые клетки способны индуцировать нейрогенез после травмы. Исследование сигнальных механизмов у регенераторно-компетентных видов позвоночных, в частности рыб с активной нейрональной регенерацией формируют перспективные направления к экспериментальному исследованию нейрогенеза у млекопитающих.

Ключевые слова: гомеостатический нейрогенез, нейральные стволовые клетки, нейротрансмиттеры, репаративный нейрогенез, Тихоокеанские лососи.

FEATURES OF NEUROGENESIS IN CHRONIC INJURY OF THE MESENCENCEPHALON AND CEREBELLUM IN JUVENILE PACIFIC CHUM SALMON ONCORHYNCHUS KETA.

Pushchina E.V.[1*], Kapustyanov I.A.[1], Stukaneva M.E.[1], Varaksin A.A.[1], Obukhov D.K.[2]
[1]National Scientific Center for Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok
[2]St. Petersburg State University, St. Petersburg
*puschina@mail.ru

Unlike mammals, fish neural stem cells are capable of neurogenesis after *injury. The signaling environment of neural stem cells is greatly altered by the presence of damaged cells and the influx of immune as well as other cells. This paper presents the results of our own studies related to the discovery of new neurogenic zones in juvenile chum salmon outside the telencephalon, in particular, in the region of the caudal mesencephalon and the cerebellum after a long-term injury. Also presented is an attempt to generalize the current ideas about the development, physiological and immune signals that act on neural stem cells in the central nervous system, directly or indirectly modulating their neurogenic state. These signals act on certain intracellular pathways, changing the structure of chromatin and the expression of some regulatory genes, which ultimately leads to regenerative neurogenesis. Translational approaches in work on neurogenesis in mammals with limited regenerative potential have shown that stem cells of the central nervous system can be reprogrammed for neurogenesis. In fish, unlike mammals, neural stem cells are able to induce neurogenesis after injury. The study of signaling mechanisms in regeneratively competent vertebrate species, in particular fish with active neuronal regeneration, form promising directions for the experimental study of neurogenesis in mammals. Unlike mammals, fish neural stem cells are capable of neurogenesis after injury. The signaling environment of neural stem cells is greatly altered by the presence of damaged cells and the influx of immune as well as other cells. This paper presents the results of our own studies related to the discovery of new neurogenic zones in juvenile chum salmon outside the telencephalon, in particular, in the region of the caudal mesencephalon and the cerebellum after a long-term injury. Also presented is an attempt to*

generalize the current ideas about the development, physiological and immune signals that act on neural stem cells in the central nervous system, directly or indirectly modulating their neurogenic state. These signals act on certain intracellular pathways, changing the structure of chromatin and the expression of some regulatory genes, which ultimately leads to regenerative neurogenesis. Translational approaches in work on neurogenesis in mammals with limited regenerative potential have shown that stem cells of the central nervous system can be reprogrammed for neurogenesis. In fish, unlike mammals, neural stem cells are able to induce neurogenesis after injury. The study of signaling mechanisms in regeneratively competent vertebrate species, in particular fish with active neuronal regeneration, form promising directions for the experimental study of neurogenesis in mammals.

Keywords: homeostatic neurogenesis, neural stem cells, neurotransmitters, reparative neurogenesis, Pacific salmon.

Введение

Исследование стадий нейронального онтогенеза различных отделов мозга рыб способно прояснить не только базовые механизмы взрослого нейрогенеза, но и внести вклад в понимание закономерностей формирования отдельных областей мозга и участия нейральных стволовых клеток в построении дифинитивной структуры мозга [1]. Ранее для прояснения того, как радиальная глия (РГ) и популяция нейроэпителиальных (НЭ) клеток приспосабливаются к непрерывному росту головного мозга, характерному для лососевых рыб, было исследовано распределение взрослых стволовыех клеток (вНСК), клеток, образованных в процессе гомеостатического нейрогенеза в теленцефалоне и зрительном тектуме мозга 3 летней форели *Oncorhynchus mikkis* [2]. Исследование свойств вНСК и нейрональных предшественников (НКП) на модели лососевых рыб дает новые данные об организации нейрогенных зон различных отделов мозга, содержащих стволовые клетки взрослого типа, отражающих их развитие, происхождение и пролиферативную динамику [3,4]. В настоящее время молекулярные сигнатуры этих популяций только начинают исследовать при гомеостазе и репарации в переднемозгового отдела позвоночных [1, 5]. За пределами конечного мозга регенеративную пластичность взрослых стволовых клеток/предшественников и их биологическое значение практически не исследованы. Высокая регенеративная и пролиферативная способности мозга молоди лососевых позволяет предполагать, что большинство взрослых стволовых клеток/клеток-предшественников,

вероятно, являются мультипотентными, поскольку они, способны заменять практически все клеточные линии, утраченные в результате повреждения, в том числе нейроэпителиальные клетки, радиальную глию, олигодендроциты и нейроны [2-4]. На сегодняшний день эта гипотеза, по-видимому, подтверждается в значительной степени покоящейся Мюллеровской глией сетчатки у взрослого человека [6] и исследованиями, проведенными на данио [7]. Тем не менее, уникальный регенеративный профиль индивидуальных клеточных фенотипов в гетерогенных нишах стволовых клеток мозга лососевых рыб, остается пока не ясен. Отличающиеся типы нейрональных предшественников, как было установлено ранее, в достаточном количестве содержатся в различных отделах головного мозга молоди Тихоокеанских лососей [2,3]. Радиальная глия дорсального паллиума конечного мозга была в центре внимания большинства исследований повреждений ЦНС у рыб [8]. Свойства вНСК/НКП интересно исследовать динамически, для различных постравматических периодов, в течение которых могут быть установлены начальный потенциал НСК и возможность участия в репаративном процессе при острой и/или хронической травме [4, 7, 8]. Сочетание экспериментального моделирования хронической и повторной острой травм может прояснить вопрос, сохраняется ли высокая производительность нейронов при повторной травматизации, что может определять особенные свойства эмбриональных и взрослых НСК и НКП лососей. В первентрикулярных областях тектума, тегментума, теленцефалона и мозжечка молоди кеты *Oncorhynchus keta* установлена высокая пролиферативная активность клеток после 3-7 дней после повреждения [3,4].

Текущие модели нервных стволовых клеток взрослых позвоночных в основном ограничиваются передним мозгом грызунов. Для исследования общих механизмов биологии нервных стволовых клеток, необходимо идентифицировать новые популяции взрослых стволовых клеток на других модельных системах и/или областях головного мозга. В исследованиях на данио детально охарактеризованы паллиальная и субпаллиальная пролиферативные зоны конечного мозга, что дает возможность для сравнения этих систем с переднемозговой пролиферативной зоной млекопитающих [8]. Пролиферация клеток в мозгу взрослых данио наблюдается в 16 нейрогенных нишах, что существенно больше, чем в мозге млекопитающих. Последующие данные показали, что использование маркера эмбриональных стволовых клеток фактора транскрипции E(spl)bHLH Her5 способно выявить и другие, альтернативные зоны

взрослого нейрогенеза в мозге рыб. В частности было продемонстровано [9], что в мозге данио экспрессия her5 не ограничивается эмбриональными нейральными предшественниками, но также определяется в мозгу взрослых данио в новой зоне пролиферации, расположенной на стыке между средним и задним мозгом. Было показано, что клетки, экспрессирующие her5 у взрослых данио медленно пролиферируют, способны к самообновлению и экспрессируют маркеры нейральных стволовых клеток [9].

Особенности нейрогенеза при хронической травме мезенцефалона у молоди кеты.

Результаты исследования экспрессии у молоди кеты Oncorhynchus keta молекулярных маркеров взрослых стволовых клеток (нестина, MAP2, виментина) после долговременной хронической травмы в сочетании с введеним бромдезоксиуредина и повторной острой травмой позволили идентифицировать ранее не описанню зону пролиферации расположенную на границе мезенцефалического тегментума в области перешейка (рис. А). В этой же области мозга была обнаружена экспрессия молекулярних маркеров вНСК, в частности нестина (рис. Б), MAP2 (рис. В), и виментина (рис. Г). Обнаружение данной популяции клеток в паренхиматозной зоне тегментума, содержащей медленно пролиферирующие клетки и экспрессию молекулярных маркеров нейрогенеза в мозге молоди кеты указывает на наличие мезенцефалической нейрогенной зоны пролиферации в мозге, возможно аналогичную таковой в мозге данио.

При долговременной травме мезенцефалического тегментума у молоди кеты была выявлена значительная экспрессия MAP2 в клетках нейроэпителиального типа в мозжечке (рис. В). Подобное усиление экспрессии молекулярных маркеров НСК/НКП ранее не было зарегистрировано, и рассматривается нами, как интегративная реакция мозга в ответ на хроническое повреждение мезенцефалона. До настоящего времени, биологические механизмы, связанные с высоким нейрорепаративным потенциалом молоди Тихоокеанских лососей остаются неизвестными, тем не менее, значительные размеры, которых достигают Тихоокеанские лососи: кета, нерка, кижуч, сима при нагуле в океане [10] свидетельствуют, что увеличение объема мышечной массы контролируется при участии множества нейронов, образующихся в течение всей жизни. Результаты исследований регенеративного потенциала популяций взрослых НСК в нейрогенных зонах за пределами переднего мозга взрослого данио [11] показали, что отдельные подтипы вНСК характеризуются различными регенеративными способностями и отличающимся молекулярным

контролем. Являются ли эти свойства следствием специфичных для клеток репаративных программ, или особенным влиянием микросреды, окружающей стволовые клетки при поражении все еще не ясно. Активация и набор вНСК критически важны для восполнения потерянных тканей в различных областях мозга. Ранее было установлено, что не активные астроциты в физиологических условиях могут быть преобразованы в нейроны in vitro и in vivo, путем настройки уровней передачи Notch сигналов или принудительного экспрессии пронейральных факторов, таких как Neurod1, и, таким образом, могут служить источником восстановления нервной системы после острой черепно-мозговой травмы [12]. Кроме того, популяции эпендимных клеток в переднем и спинном мозге взрослых млекопитающих также обладают регенеративным потенциалом для образования нейронов [13]. В отличие от моделей млекопитающих, мозг лососей рассматривается нами в качестве предпочтительной модели позвоночных для расширения понимания клеточных и молекулярных программ, необходимых для успешного роста и регенерации ЦНС.

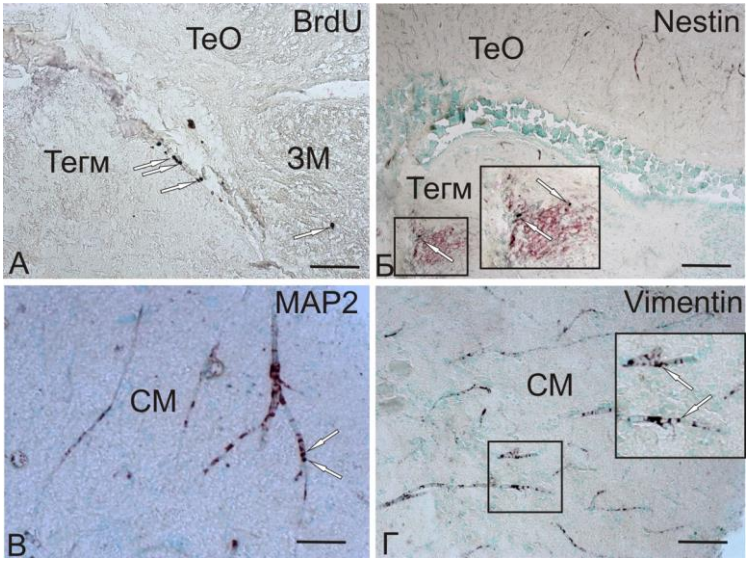


Рис. 1. Локализация бромдезоксиуредина и экспрессия молекулярных маркеров нейрогенеза в мезенцефалической нейрогенной зоне молоди кеты Oncorhynchus keta через 75 дней после повреждения среднего мозга. А – BrdU-иммунопозитивные клетки (белые стрелки) в

каудальной зоне мезенцефалического тегментума, TeO – оптический тектум, ЗМ – заслонка мозжечка, Тегм – тегментум. Б – иммунолокализация нестина в клетках (белые стрелки) каудального тегментума (врезка); В – MAP2-иммунопозитивные клетки (белые стрелки) в стволе мозга (СМ) кеты; Г – виментин-иммунопозитивные клетки (белые стрелки) в стволе мозга молоди кеты. Иммунопероксидазное маркирование. Масштабный отрезок: А, Б, Г – 100 мкм, В – 50 мкм.

Нейротрансмиттеры в развитии нейрогенеза позвоночных.

Нейральные стволовые клетки исключительно чувствительны к передаче сигналов нейротрансмиттеров в различных областях ЦНС [14], что позволяет мозгу производить определенное количество нейронов в соответствии с потребностями развития или физиологическими потребностями. Например, нисходящие дофаминергические аксоны стимулируют генерацию двигательных нейронов в развивающемся спинном мозге рыбок данио, что сопоставимо с развитием нисходящих проекций, коорелирующим с созреванием их спинномозговой мишени [15]. У молоди Тихоокеанской симы *Oncorhynchus masou* перивентрикулярные области диенцефалона, гипоталамуса, а также ствола мозга и спинного мозга содержат многочисленные ТН-иммунопозитивные клетки, обладающие сходным влиянием [16]. Однако уровни дофамина в среднем мозге саламандр обеспечивают отрицательную обратную связь для их собственного производства [17] и, следовательно, избирательное удаление дофаминергических клеток приводит к ускорению нейрогенеза этот тип нейрональных клеток в среднем мозге саламандры. В развивающимся спинном мозге данио, серотонин оказывает аналогичное стимулирующее действие на нейрогенез, как и дофамин [18]. У молоди данио (в возрасте 8-10 недель), физические упражнения усиливают нейрогенез позвоночника через ацетилхолин, тогда как тормозной передатчик ГАМК ослабляет спинальный нейрогенез [19].

Нейротрансмиттеры в регенеративном нейрогенезе

После травмы позвоночника наблюдается активный синтез вышеперечисленных нейротрансмиттеров и усиление их роли в качестве промоутеров (дофамин, серотонин а также ацетилхолин) или ингибиторов (ГАМК) нейрогенеза [14]. Снижение уровня рецепторов ГАМК после тренировки усиливает нейрогенез, а также может быть механизмом, посредством которого облегчается регенеративные нейрогенез [19]. ГАМК оказывает ингибирующее влияние на

регенеративный нейрогенез в сетчатке, где уровни этого трансмиттера снижаются после травмы [20]. Следовательно, изменения содержания нейротрансмиттеров после травмы способствуют регенеративному нейрогенезу либо путем снятия торможения, либо непосредственной стимуляции нейрогенеза.

Относительно мало известно о том, как нейротрансмиттеры передают сигналы, действуя внутри стволовых клеток/клеток-предшественников. Канонический нейротрансмиттер при передаче сигналов действует через малые G-белки, чтобы влиять на внутриклеточные уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который, в свою очередь, опосредует другие сигнальные пути [21]. Например, фармакологическое увеличение дофаминовой сигнализации повышает экспрессию нижестоящего гена ptch2 через Shh сигнальный путь, одновременно с регенерацией, предполагая, что передача дофаминовых сигналов сходится на пути Shh, вероятно, через путь цАМФ/протеинкиназы А [15]. Арилуглеводородный рецептор (AhR), действуя как транскрипционный фактор, может активироваться кинуреновой кислотой в поврежденном конечном мозге взрослых данио и способствует прямому преобразование клеток радиальной глии в нейроны [22].

Иммунные сигналы модулируют нейрогенез

Стволовые клетки/клетки-предшественники также чувствительны к сигналам иммунной системы. Иммунные клеточные сигналы обычно не являются сигналами развития в процессе нейрогенеза и, но могут играть регенераторно-специфический роли, при дифференциации в процессе онтогенеза и модуляциифизиологических сигналов. Манипуляции с иммунным ответом свидетельствуют о положительном влиянии на регенеративный нейрогенез; ослабление иммунного ответа с глюкокортикоидом дексаметазоном снижает регенеративный нейрогенез [14, 23]. И наоборот, усиление иммунного ответа обработка бактериальными липополисахаридами или дрожжевой поверхностью глюканзимозан способствует регенерации головного [23] и спинного мозга [24].

Самые ранние сигнальные молекулы, действующие на клетки-предшественники и связанные с иммунным ответом могут исходить от «молекулярных паттернов, связанных с повреждением» из разрушенных клеток, что приводит к быстрой инвазии нейтрофилами в место повреждения. В спинном мозге, например, инвазия нейтрофилов сопровождается прибытием клеток микроглии и макрофагов [25]. Т-клетки прибывают последними к месту повреждения ЦНС [26]. Однако

нейтрофилы и периферические макрофаги не проникают в сетчатку после селективной абляции [27], и это показывает, что иммунный ответ может различаться для разных областей ЦНС и видов повреждений. Однако для многих потенциальных взаимодействий сигнал/рецептор стволовые клетки/клетки-предшественники экспрессируют соответствующие рецепторы и активируют нижестоящие гены или репортеры специфического пути [14]. Кроме того, стволовые/прогениторные клетки находятся в непосредственной близости от источников сигналов, предполагая, что, по крайней мере частично, эти сигналы действуют непосредственно на сами стволовые/прогениторные клетки.

Нейрогенные зоны в мозге рыб

Нейрогенный участок, расположенный на границе между средним и задним мозгом у данио экспрессирует трансген her5:gfp в ограниченном кластере клеток в околожелудочковой области на границе среднего мозга и ствола [9]. Эти her5:gfp-положительные клетки у данио соответствуют нескольким общим признакам нейральных стволовых клеток. В частности, субпопуляция клеток her5:gfp данио характеризуется медленным пролиферативным циклом, экспрессирует маркеры стволовых клеток GFAP, BLBP, Sox2 и Musashi и может дифференцироваться в нейроны и глию [9]. Отличительной чертой таких her5:gfp-экспрессирующих клеток данио является их сходство с II типом клеток ниши телеэнцефалона. Однако доказательства наличия промежуточного быстро пролиферирующего типа клеток, такой как транзитные амплифицирующие клетки млекопитающих в нише стволовых клеток или клетки III типа телэнцефалической ниши головного мозга данио отсутствуют.

Для проверки гипотезы о потенциальной стволовой природе Her-5-экспрессирующих клеток у данио, эта область мозга была проанализирована на потенциальную экспрессию характерных маркеров НСК [9]. В мозге млекопитающих наличие предшественников диагностируется по экспрессии нестина или RC2 [28], однако у данио антитела к данным маркера не дали положительной реакции. Тем не менее, у данио было обнаружена экспрессия нескольких других меркеров нейральных стволовых клеток в популяции Her5-позитивных или околожелудочковых Her5-GFP-иммунопозитивных клеток. В частности, было установлено, что эти клетки экспрессируют маркер радиальной глии BLBP или астроцитарный маркер GFAP, наличие которых обычно указывает на НСК [28]. Также была выявлена субпопуляция Her5-GFP-иммунопозитивных клеток, экспрессирующих фактор транскрипции

Sox2 [29] и детерминанты асиметрично наследуемых клеточных судеб Musashi [30]. Наличие данных факторов связаны с потенциалом нейральных предшественников у млекопитающих. Таким образом, Her5-позитивные и вентрикулярные Her5-GFP-иммунопозитивные клетки у данио обладают молекулярными свойствами стволовых клеток.

Эти результаты имеют большое значение для понимания биологии вНКС, во-первых, они предоставляют нам новую модель для сравнения с известными популяциями нейральных стволовых клеток млекопитающих. Во-вторых, среднемозговая популяция стволовых клеток находится за пределами конечного мозга, что дает возможность для дальнейшего расширения области исследования характеристик нейральных стволовых клеток в пределах головного мозга взрослых позвоночных. В-третьих, обнаруженные нами зоны нейрогенеза на границе среднего мозга и перешейка у молоди кеты, во многом соответствуют результатам исследований на данио, и могут в дальнейшем изучаться с помощью трансгенного анализа. Мы полагаем, что представленные результаты предоставляют новую интересную модель, которая поможет охарактеризовать общие принципы биологии взрослых нейральных стволовых клеток у Тихоокеанских лососей.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (Проект № 20-34-90091).

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Национальный научный центр биологии моря им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН на базе Ресурсного центра ННЦМБ ДВО РАН, и Комитета по этике, регламентирующий гуманное обращение с экспериментальными животными.

Литература

1.Alunni A., Bally-Cuif L. A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates // Development. 2016. Vol. 143. Pp. 741–753.

2.Pushchina E.V., Varaksin A. A., Obukhov D.K. Molecular markers of adult neurogenesis in the telencephalon and tectum of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. Pp. 1188.

3.Pushchina E. V., Kapustyanov I. A., Varaksin A. A. Neural stem cells/neuronal precursor cells and postmitotic neuroblasts in constitutive neurogenesis and after, traumatic injury to the mesencephalic tegmentum of

juvenile chum salmon, Oncorhynchus keta // Brain Sci. 2020a. Vol. 10. Pp. 65.
4.Pushchina E. V., Stukaneva M. E., Varaksin A. A. Hydrogen Sulfide Modulates Adult and Reparative Neurogenesis in the Cerebellum of Juvenile Masu Salmon, *Oncorhynchus masou* // *Int. J. Mol. Sci*. 2020b. Vol. *21. Pp.* 9638.
5.Dray N., Bedu S., Vuillemin N., Alunni A., Coolen M., Krecsmarik M. Large-scale live imaging of adult neural stem cells in their endogenous niche // Development. 2015. Vol. 142. Pp. 3592–3600.
6.Wan J., Zhao X.-F., Vojtek A., Goldman D. Retinal injury, growth factors, and cytokines converge on β-catenin and pStat3 signalling to stimulate retina regeneration // Cell Rep. 2014. Vol. 9. Pp. 285–297.
7.Ganz J., Kroehne V., Freudenreich D., Machate A., Geffarth M., Braasch I. Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis // F1000Res. 2015. Vol. 520. Pp. 633–655.
8.Folgueira M., Bayley P., Navratilova P., Becker T. S., Wilson S. W., Clarke, J. D. W. Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon // Neural. Dev. 2012. Vol. 7. Pp. 32.
9.Chapouton P., Adolf B., Leucht C., Tannhauser B., Ryu S., Driever W., Bally-Cuif L. her5 expression reveals a pool of neural stem cells in the adult zebrafish midbrain // Development. 2006. Vol. 133. Pp. 4293–4303.
10.Beamish R. The need to see a bigger picture to understand the ups and downs of Pacific salmon abundances // ICES Journal of Marine Science. 2022. Vol. 79. Pp. 1005–1014.
11.Kaslin J., Kroehne V., Ganz J., Hans S., Brand M. Distinct roles of neuroepithelial-like and radial glial-like progenitor cells in cerebellar regeneration // Development. 2017. Vol. 144. Pp. 1462–1471.
12.Brulet R., Matsuda T., Zhang L., Miranda C., Giacca M., Kaspar B.K., Nakashima K., Hsieh J. NEUROD1 instructs neuronal conversion in non-reactive astrocytes // Stem Cell Rep. 2017. Vol. 8. Pp. 1506–1515.
13.Gascón S., Masserdotti G., Russo G. L., Götz M. Direct neuronal reprogramming: achievements, hurdles, and New Roads to Success // Cell Stem Cell. 2017. Vol. 21. No. 1. Pp. 18–34.
14.Becker T., Becker C.G. Regenerative neurogenesis: the integration of developmental, physiological and immune signals // Development. 2022. Vol. 149, dev199907. doi:10.1242/dev.199907
15.Reimer M. M., Norris A., Ohnmacht J., Patani R., Zhong Z., Dias T. B., Kuscha V., Scott A. L., Chen Y. C., Rozov S. Dopamine from the brain promotes spinal motor neuron generation during development and adult regeneration // Dev. Cell. 2013. Vol. 25. Pp. 478-491.

16.Pushchina, E.V.; Varaksin, A.A.; Obukhov, D.K. Features of adult neurogenesis and neurochemical signals in the cherry salmon brain // Neural Regen. Res. 2013. Vol. 8. No. 1. Pp. 13-23.
17.Berg, D. A., Kirkham, M., Wang, H., Frisen, J. and Simon, A. Dopamine controls neurogenesis in the adult salamander midbrain in homeostasis and during regeneration of dopamine neurons // Cell Stem Cell. 2011. Vol. 8. Pp. 426-433.
18.Barreiro-Iglesias A., Mysiak K. S., Scott A. L., Reimer M. M., Yang Y., Becker C. G., Becker, T. Serotonin promotes development and regeneration of spinal motor neurons in Zebrafish // Cell Rep. 2015. Vol. 13. Pp. 924-932.
19.Chang W., Pedroni A., Bertuzzi M., Kizil C., Simon A., Ampatzis, K. Locomotion dependent neuron-glia interactions control neurogenesis and regeneration in the adult zebrafish spinal cord // Nat. Commun. 2021. Vol. 12. Pp. 4857.
20.Kent M. R., Kara N., Patton J. G. Inhibition of GABA(A)-ρ receptors induces retina regeneration in zebrafish // Neural Regen. Res. 2021. Vol. 16. Pp. 367-374.
21.Berg D. A., Belnoue L., Song H., Simon A. Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain // Development. 2013. Vol. 140. Pp. 2548-2561.
22.Siddiqui T., Bhattarai P., Popova S., Cosacak M. I., Sariya S., Zhang Y., Mayeux R., Tosto G., Kizil C. KYNA/Ahr signaling suppresses neural stem cell plasticity and neurogenesis in adult zebrafish model of Alzheimer's disease // Cells. 2021. Vol. 10. Pp. 2748.
23.Caldwell L. J., Davies N. O., Cavone L., Mysiak K. S., Semenova S. A., Panula P., Armstrong J. D., Becker C.G., Becker T. Regeneration of dopaminergic neurons in adult Zebrafish depends on immune system activation and differs for distinct populations // J. Neurosci. 2019. Vol. 39. Pp. 4694-4713.
24.Ohnmacht J., Yang Y., Maurer G. W., Barreiro-Iglesias A., Tsarouchas T. M., Wehner D., Sieger D., Becker C. G. and Becker T. Spinal motor neurons are regenerated after mechanical lesion and genetic ablation in larval zebrafish // Development. 2016. Vol. 143. Pp. 1464-1474.
25.Tsarouchas T. M., Wehner D., Cavone L., Munir T., Keatinge M., Lambertus M., Underhill A., Barrett T., Kassapis E., Ogryzko N. Dynamic control of proinflammatory cytokines Il-1β and Tnf-α by macrophages in zebrafish spinal cord regeneration // Nat. Commun. 2018. Vol. 9. Pp. 4670.
26.Hui S. P., Sheng D. Z., Sugimoto K., Gonzalez-Rajal A., Nakagawa S., Hesselson D., Kikuchi K. Zebrafish regulatory T cells mediate organ-specific regenerative programs // Dev. Cell. 2017. Vol. 43. Pp. 659-672.

27.White, D. T., Sengupta, S., Saxena, M. T., Xu, Q., Hanes, J., Ding, D., Ji, H. and Mumm, J. S. Immunomodulation-accelerated neuronal regeneration following selective rod photoreceptor cell ablation in the zebrafish retina // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. Vol. 114. Pp. E3719-e3728.
28.Götz M., Barde Y. A. Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons // Neuron. 2005. Vol. 46. Pp. 369-372.
29.Ferri A. L. M., Cavallaro M., Braida D., Di Cristofano A., Canta A., Vezzani A., Ottolenghi S., Pandolfi P. P., Sala M., De Biasi, S. Sox2 Deficiency causes neurodegeneration and impaired Neurogenesis in the adult mouse brain // Development. 2004. Vol. 131. Pp. 3805-3819.
30.Sakakibara, S., Nakamura, Y., Yoshida, T., Shibata, S., Koike, M., Takano, H., Ueda, S., Uchiyama, Y., Noda, T. and Okano, H. (2002). RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 15194-15199.

© Пущина Е.В., Капустянов И.А., Стуканева М.Е., Вараксин А.А., Обухов Д.К., 2022

УДК: *577.25*
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.26

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЛАНОКОРТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1-ГО ТИПА В НЕЙРОНАХ *LOCUS COERULEUS* МЫШИ C57BL/6J

© Романова И.В.*, Михайлова Е.В., Михрина А.Л.
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия
* irinaromanova@mail.ru

Аннотация. С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения и конфокальной микроскопии проведен анализ распределения меланокортиновых рецепторов 1-го типа (МКР1) в нейронах locus coeruleus самцов и самок мыши C57Bl/6J. Полученные данные демонстрируют иммуноэкспрессию МКР1 в телах норадренергических и ГАМКергических нейронов и отсутствие видимых половых различий. Обсуждаются механизмы влияния меланокортиновых пептидов на функциональную активность норадренергических нейронов через различные пути меланокортиновой сигнализации как через прямое влияние на норадренергические нейроны, так и через влияние на ГАМК-нейроны. Обсуждается протективная роль меланокортинов через МКР1-зависимый путь во влиянии на норадренергические нейроны мозга.

Ключевые слова: меланокортиновые рецепторы, норадреналин, ГАМК, нейропротекция.

ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF TYPE 1 MELANOCORTIN RECEPTORS IN MOUSE C57BL/6J *LOCUS COERULEUS* NEURONS

Romanova I.V.*, Mikhailova E.V., Mikhrina A.L.
I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;
* irinaromanova@mail.ru

Abstract. Using double fluorescent immunolabeling and confocal microscopy we analyzed the distribution of type 1 melanocortin receptors (MCR1) in neurons of the locus coeruleus of male and female C57Bl/6J mice. The data obtained demonstrate the immunoexpression of MCR1 in the

bodies of noradrenergic and GABAergic neurons and the absence of visible sex differences. The mechanisms of the influence of melanocortin peptides on the functional activity of noradrenergic neurons through various pathways of melanocortin signaling, both through a direct effect on norepinephrinenergic neurons and through on GABA neurons, are discussed. The protective role of melanocortins through the MCR1-dependent pathway in influencing the norepinephrinergic neurons of the brain is discussed.

Keywords: melanocortin receptors, norepinephrine, GABA, neuroprotection.

Введение

Меланокортиновые пептиды (α-, β- и γ-меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ) и адренокортикотропный гормон) образуются из одной молекулы-предшественника - про-опиомеланокортина (ПОМК), которые экспрессируется в различных тканях организма млекопитающих и других позвоночных [1]. Влияние меланокортиновых пептидов осуществляются через пять типов меланокортиновых рецепторов (МКР1-5), которые сопряжены с G-белками и активацией цАМФ в клетках, регулируемой различными внутриклеточными посредниками [2]. В мозге самые крупные популяции ПОМК- нейронов выявлена в аркуатном ядре гипоталамуса и в ядре одиночного тракта [1]. Продукция ПОМК также показана и в нейронах гиппокампа, коры больших полушарий [3, 4].

Проекции ПОМК-нейронов широко распространены в мозге, что свидетельствует о вовлечении меланокортиновых пептидов в контроль различных функций, в частности в регуляцию энергетического баланса, пищевого поведения, контроль когнитивных функций и др. [5, 6, 7]. При этом в литературе утвердилось мнение о тканеспецифичной экспрессии МКР: многочисленные данные подтверждают экспрессию в нейронах различных отделов мозга МКР3 и МКР4, основным агонистом которых является α-МСГ [8, 2]. Это прежде всего связано с участием этих рецепторов в регуляции пищевого поведения и энергетического баланса.

Роль МКР1 в организме в основном связывали с регуляцией меланогенеза, так как экспрессия МКР1 выявлена в коже у взрослых млекопитающих [9]. Однако экспрессия этого гена в макрофагах, лимфоцитах и других тканях [9] дает основания для рассмотрения роли МКР1-опосредованного пути как защитного механизма клеток и, в частности, нейронов мозга, который, очевидно реализуется при различных воспалительных процессах [10]. Вместе с тем экспрессия

Мкр1 выявлена у эмбрионов различных видов позвоночных, что может свидетельствовать о плейотропном эффекте гена *Мкр1* для нормального эмбрионального развития организма, что, по-видимому, эволюционно является весьма консервативным свойством [11].

В ЦНС экспрессия гена *Мкр1* у взрослых особей была выявлена в среднем мозге в области околоводопроводного серого вещества [12, 13], а также в нейронах черной субстанции [14]. Полученные нами ранее результаты демонстрируют экспрессию гена *Мкр1* в различных областях мозга мыши (в гипоталамусе, продолговатом и среднем мозге, гиппокампе, коре больших полушарий), а также возможность различных нейронов гипоталамуса экспрессировать МКР1, в частности и самих ПОМК-нейронов, что, очевидно, свидетельствует о роли МКР1 как ауторецептора [15].

Голубое пятно (*locus coeruleus*) – самая крупная норадренергическая структура мозга, вовлеченная в контроль различных его функций. Проекции ПОМК-нейронов показаны в этой структуре [16]. В самих норадренергически нейронах экспрессируются МКР3, но не МКР4 рецепторы, однако последние выявлены в ГАМК-нейронах locus coeruleus, вовлеченных в контроль биосинтеза норадреналина [17]. **Целью настоящего исследования** было оценить возможность иммуноэкспрессии МКР1 в различных нейронах *locus coeruleus*, что дает возможность оценить возможность влияния МКР1-зависимого пути в регуляции биосинтеза норадреналина.

Материалы и методы

В экспериментах использованы половозрелые самцы (*n*=3) и самки (*n*=3) мыши линии C57Bl/6J (масса 22–24 г). Животных наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг). Для морфологических исследований мыши были перфузированы транскардиально сначала 0.1 М натрий-фосфатным буфером (pH 7.4) и затем 4%-ным раствором пара-формальдегида в 0.2 М натрий-фосфатном буфере. Мозг дофиксировали в течение ночи (4° C) в том же фиксаторе, промывали буфером и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, разведенной в 0.02 М натрий-фосфатном буфере, замораживали в изопентане (- 42° C), охлажденном в сухом льду. С помощью криостата (CM-1520, Leica Microsystems, Германия) из области продолговатого мозга с *locus coeruleus* получали чередующиеся серии фронтальных срезов (16 мкм) согласно атласу мозга мыши [18], каждый пятый срез монтировали на одно стекло Superfrost/plus (Menzel, Германия), высушивали при комнатной температуре и хранили при -20° C. Каждое пятое стекло окрашивали толуидиновым синим для контроля области

локализации locus coeruleus. Двойное иммуномечение проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [15]. После демаскировки антигена кипячением в натрий-цитратном буфере (pH 6.0), срезы промывали в 0.02 М фосфатно-солевом буфере (pH 7.4) и блокировали в 8% смеси сывороток (3% - козы, 2% быка и 3% цыплёнка), растворенных в фосфатно-солевом буфере с 0.01% Triton X-100. Затем срезы инкубировали в течение 48 ч (4° C) с первичными антителами, которые разводили в 2% блокирующем растворе. Для реакций использовали смесь первичных антител 1) кролика против МКР1 (Elabscience, США) в разведении 1:200 и мыши против тирозингидроксилазы - первого фермента биосинтеза норадреналина (Sigma, США) в разведении 1:1000; 2) кролика против МКР1 и смесь антител мыши против ферментов биосинтеза ГАМК - маркеров ГАМК-нейронов: глутаматдекарбоксилазы GAD67 (Invitrogen, США) и GAD 65 (Abcam, Великобритания), разведенных 1:1000. 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, США) в разведении 1:1000. После промывки в фосфатном буфере срезы заключали под покровное стекло с помощью среды Mowiol (Sigma, США) и хранили при 4° C до ее полимеризации. Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли негативным контролем (реакции без первичных или вторичных антител).

Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 и лазерной сканирующей конфокальной установки Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Был использован иммерсионный объектив x63, лазеры с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF.

Результаты и обсуждение

Тирозингидроксилаза – первый скорость-лимитирующий фермент биосинтеза катехоламинов и широко используется как маркер норадренергических нейронов для их выявления в норадренергических структурах, в которых, в отличие от дофаминергических нейронов, также экспрессируется и дофамин-бета-гидроксилаза – фермент, преобразующий дофамин в норадреналин. Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения свидетельствует о присутствии МКР1 в телах всех тирозингидроксилаза-иммунопозитивных клеток *locus coeruleus* (рис. 1), что свидетельствует об обильной экспрессии

этого типа рецепторов норадренергическими нейронами в данной структуре мозга. При этом в отростках норадренергических нейронов МКР1 не выявлялись, но обнаружены в тирозингидроксилаза-негативных структурах, локализованных рядом (латерально и медиально с телами норадренергических нейронов, а также в небольшой степени и между ними (рис. 1). Визуально каких-либо отличий в распределении МКР1 в тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронах в *locus coeruleus* у самцов и самок мыши мы не отметили.

Хорошо известно, что ГАМК-нейроны участвуют в регуляции функциональной активности активности катехоламинергических нейронов и присутствуют во всех катехоламинергических формациях мозга. В *locus coeruleus* компактная группа тел ГАМК-нейронов располагается медиально от тел норадренергических нейронов в области *peri-locus coeruleus* [19], а также отдельные ГАМК-нейроны локализованы с латеральной поверхности *locus coeruleus*. Известно, что в биосинтезе ГАМК принимают участие два фермента GAD65 и GAD67 [20], причем первый осуществляет свое действие в телах, второй – в отростках ГАМК-нейронов. Таким образом, использование антител к обоим ферментам дает возможность лучше маркировать ГАМК-нейроны. Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения свидетельствует о присутствии МКР1 в телах GAD(65/67) – иммунопозитив-ных клеток, локализованных вокруг норадренергических нейронов а также, в меньшей степени, и между ними. Визуальных отличий между самцами и самками в распределении МКР1 в ГАМК-нейронах *locus coeruleus* мы не отметили. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют как о возможности прямого влияния меланокортинов на норадренергические нейроны через МКР1-путь, так и опрсредованно, через ГАМК-нейроны, т.е. через регуляцию норадреналин-ГАМК взаимодействий. С учетом данных о том, что в норадренергических нейронах осуществляется экспрессии МКР3, а в ГАМК-нейронах и МКР4, а также о том, что введение блокатора МКР3/4 в *locus coeruleus* влияло как на биосинтез норадреналина, так и на системы его биоситеза [17], данные о распределении МКР1 в *locus coeruleus* расширяет представления о путях влияния меланокортинов на катехоламинергические нейроны мозга.

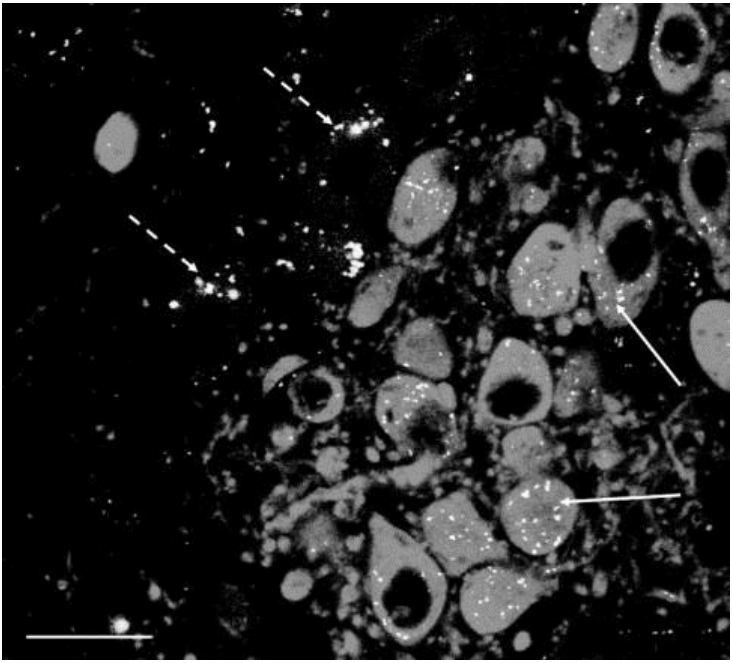


Рис. 1. Черно-белое изображение двойного флуоресцентного иммуномечения меланокортиновых рецепторов 1-го типа и тирозингидроксилазы в locus coeruleus мыши C57BL/6J. *Сплошные стрелки* указывают на рецепторы (светлые точки), локализованные на поверхности и в телах норадренергических нейронов, пунктирные стрелки – рецепторы (*светлые точки*) в тирозингидроксилаза-негативных структурах. Масштаб 25 мкм.

Ранее было показано, что ген *Мкр1* широко экспрессируются в различных отделах мозга [15]. Иммуноэкспрессия МКР1 выявлена в нейронах черной субстанции [14], в вазопрессин- и окситоцинергических нейронах гипоталамуса, в различных популяциях ПОМК-нейронов [15]. Представленные нами данные впервые демонстрируют существование МКР1-зависимого пути влияния меланокортинов на норадренергические нейроны.

В настоящее время в литературе широко обсуждается вопрос о защитных свойствах меланокортинов, которые реализуются через МКР1-зависимый путь [21, 22, 23]. Полученные нами данные расширяют представления о меланокортиновом сигналинге в ЦНС млекопитающих, роли МКР1-зависимого пути в регуляции синтеза

меланокортиновых пептидов [15], обладающих протективными свойствами, которые, в условиях развития нейровоспаления, могут быть направлены на поддержание жизнеспособности нейронов мозга и, в частности, катехоламинергических нейронов, которые прежде всего подвержены гибели при нейродегенеративных заболеваниях.

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования ИЭФБ РАН и поддержано госзаданием (№ АААА-А18-118012290427-7).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объеков исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Cone, R.D. Studies on the physiological functions of the melanocortin system // Endocr. Rev. 2006. Vol. 27. Pp. 736–749. DOI: 10.1210/er.2006-0034

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. No7. Pp.1331-45. DOI: doi: 10.1007/s00018-014-1800-3.

3. Shen Y., Tian M., Zheng Y., Gong F., Fu A. K.Y., Ip N.Y. Stimulation of the hippocampal POMC/MC4R circuit alleviates synaptic plasticity impairment in an alzheimer’s disease model // Cell Reports. 2016. Vol. 17. No 7. Pp. 1819–1831. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.10.043

4. Chen J., Yang W. Influence of acute and chronic treadmill exercise on rat brain POMC gene expression // Med. Sci. Sports Exerc. 2000. Vol. 32. No 5. Pp. 954–957. doi: 10.1097/00005768-200005000-00012

5. Olney J.J., Navarro M. and Thiele T. E. Targeting central melanocortin receptors: a promising novel approach for treating alcohol abuse disorders // Frontiers in Neuroscience. Neuropharmacology. 2014. Vol. 8 (Article 128). DOI: 10.3389/fnins.2014.00128

6. Krashes M.J., Lowell B.B., and Garfield A.S. Melanocortin-4 receptor–regulated energy homeostasis // Nat. Neurosci. 2016. Vol. 19. No 2. Pp. 206–219. DOI: 10.1038/nn.4

7. Shen W.J., Yao T., Kong X., Williams K.W., Liu T. Melanocortin neurons: Multiple routes to regulation of metabolism // Biochim. Biophys.

Acta. Mol. Basis Dis. 2017. Vol. 1863 (No 10, Pt. A). Pp. 2477-2485. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.05.007.
8. Mountjoy K.G. Distribution and Function of Melanocortin Receptors within the Brain // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. Vol. 681. Pp. 29–48. DOI: 10.1007/978-1-4419-6354-3_3.
9. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Durymanov M.O., Sobolev A.S. Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor // Biochemistry (Moscow). 2013. Vol. 78. No 11. Pp. 1228-1237. DOI: 10.1134/S0006297913110035.
10. Calcia M.A., Bonsall D.R., Bloomfield P.S., Selvaraj S., Barichello T., Howes O.D. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness // Psychopharmacology (Berl). 2016. Vol. 233. No. 9. Pp.1637-1650. doi: 10.1007/s00213-016-4218-9
11. Thomas A.C., Heux P., Santos C., Arulvasan W., Solanky N., Carey M.E., Gerrelli D.,
Kinsler V.A., Etchevers H.C. Widespread dynamic and pleiotropic expression of the
melanocortin-1-receptor (MC1R) system is conserved across chick, mouse and human
embryonic development // Birth Defects Res. 2018. Vol. 110. No 5. Pp. 443-455. DOI: 10.1002/bdr2.1183
12. Xia Y., Wikberg J.E., Chhajlani V. Expression of melanocortin 1 receptor in periaqueductal gray matter // Neuroreport. 1995. Vol. 6. No 16. Pp. 2193-2196. DOI: 10.1097/00001756-199511000-00022
13. Catania A., Lonati C., Sordi A., Carlin A, Leonardi P, and Gatti S. The Melanocortin System in Control of Inflammation // The Scientific World JOURNAL. 2010. Vol. 10. Pp. 1840–1853. DOI: 10.1100/tsw.2010.173
14. Chen X., Chen H., Cai W., Maguire M., et al. The Melanoma-Linked “Redhead” MC1R Influences Dopaminergic Neuron Survival // Ann. Neurol. 2017. Vol. 81. No 3. Pp. 395–406. DOI: 10.1002/ana.24852.
15. Romanova I.V., Mikhailova E.V., Mikhrina A.L., Shpakov A.O. Type 1 melanocortin receptor in proopiomelanocortin-, vasopressin- and oxytocin-immunopositive neurons in different areas of mouse brain // Anatomical Record. 2022. Article ID: ar_24934 DOI: 10.1002/AR.24934
16. Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J. Anatomy of an Endogenous Antagonist: Relationship between Agouti-Related Protein and Proopiomelanocortin in Brain // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. Pp: 1–7. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-j0004.1999

17. Mikhrina A.L., Saveleva L.O., Morina I Yu., Romanova I.V. The role of the active fragment AgRP 25-51 in the regulation of the functional activity of norepinephrinergic neurons locus coeruleus and in the biosynthesis of norepinephrine // J. Evol. Biochem. and Physiol. 2021. Vol. 57. No 6. Pp.1490-1498. DOI: 10.1134/S0022093021060259
18. Paxinos G., Franklin K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Int Standard Book Number: 0-12-547636-1. Eds Press. 2001. CD-ROM. http://www.academicpress.com
19. Aston-Jones G. Locus Coeruleus, A5 and A7 Noradrenergic Cell Groups. In: The rat nervous system. Elsevier. Third Edition. USA. 2004. Ch. 11. Pp. 259–294.
20. Kaufman D.L., Houser C.R., Toin, A.J. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions // J. Neurochem. 1991. Vol.56. Pp.720-723. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb08211.x
21. Wang W., Guo D.Y., Lin Y.J., Tao Y.X. Melanocortin Regulation of Inflammation // Front Endocrinol (Lausanne). 2019. Vol. 10. No 683. Pp. 1-26. doi: 10.3389/fendo.2019.00683
22. Xu W., Yan J., Ocak U., Lenahan C., Shao A., Tang J., Zhang J., Zhang J.H. Melanocortin 1 receptor attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage by controlling mitochondrial metabolism via AMPK/SIRT1/PGC-1α pathway in rats // Theranostics. 2021. Vol. 11. No. 2. Pp. 522-539. doi: 10.7150/thno.49426
23. Yu S., Doycheva D.M., Gamdzyk M., Gao Y., Guo Y., Travis Z.D., Tang J., Chen W.X., Zhang J.H. BMS-470539 Attenuates Oxidative Stress and Neuronal Apoptosis via MC1R/cAMP/PKA/Nurr1 Signaling Pathway in a Neonatal Hypoxic-Ischemic Rat Model // Oxid Med.Cell Longev. 2022. 2022:4054938. doi: 10.1155/2022/4054938

© Романова И.В., Михайлова Е.В., Михрина А.Л., 2022

УДК: 591.482
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.27

ЦИТОМОРФОЛОГИЯ СПИННОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ КУР

© Сковородин Е.Н. *, Вехновская Е.Г.
Башкирский государственный аграрный университет, г. Уфа
*skovorodinen@mail.ru

Аннотация. Спинномозговые ганглии лабораторных животных и человека изучены довольно подробно. Сведений о развитии этих органов у кур недостаточно и проводились в основном на эмбрионах. Целью исследования было изучить морфологические проявления закономерностей адаптивной перестройки элементов нервной ткани чувствительного звена рефлекторной дуги в постэмбриональном онтогенезе и в зависимости от разной степени двигательной активности кур. Объектом исследования служили куры от суточного до 180-ти суточного возраста. Опытная группа, в отличие от контрольной, получала дозированное принудительное движение. Спинномозговые ганглии поясничного отдела, извлекали, фиксировали. Применяли метод серебряной импрегнации, окрашивали гематоксилином и эозином. Тигроидное вещество выявляли методом Ниссля. Нуклеопротеиды выявляли по методу Эйнарсона, и с помощью цитофотометра оценивали содержание нуклеиновых кислот в нейронах и глиоцитах. Активность сукцинатдегидрогеназы оценивали с помощью нитро-СТ. Электронную микроскопию проводили по общепринятой методике. У кур выявлены существенные видовые особенности спинномозговых ганглиев: ганглии совмещены с симпатической цепочкой; содержат в своем составе диффузные или узелковые скопления лимфоцитов; нейроны располагаются рядами, в основном по периферии ганглия; основной отросток нейронов имеет прямолинейный ход; ядра нервных клеток содержат чаще два крупных ядрышка; базофильная субстанция варьирует по строению и локализации, может быть представлена мелкими, крупными глыбками расположенными равномерно, или образующим ячеистый рисунок, или сконцентрированными преимущественно на периферии нейрона. Нейроны различаются по плотности цитоплазмы, количеству, характеристике и распределению органелл. Окончательная дифференциация нейронов и других структур ганглия к моменту вылупления не завершена и продолжается до 150-ти суток постэмбрионального развития, к началу полового созревания. Нейрон-

глиальные отношения в постэмбриональном онтогенезе усложняются. Это выражается в утолщении мантийной оболочки, увеличении количества сателлитов, объема их ядер, размеров и отростчатости цитоплазмы, увеличении количества нуклеиновых кислот и активности СДГ в ней. Глиоциты характеризуются разной степенью развития синтетических, транспортных и энергетических систем. Растет величина выступов и инвагинаций плазмолемм нейронов и сателлитов. Спинномозговые ганглии кур, выращенных на птицефабрике с применением дозированного принудительного движения, в отличии от контрольной группы характеризуются меньшим относительным количеством средних нейронов, средним объемом тел нервных клеток и скоростью их роста, большим ядерно-плазматическим отношением, средним объемом ядер сателлитов, активностью СДГ и количеством нуклеиновых кислот в нейронах и глиоцитах.

Ключевые слова: спинномозговые ганглии; нейроны; куры; глиоциты; постэмбриональный онтогенез

CYTOMORPHOLOGY OF SPINAL GANGLIA OF CHICKENS

Skovorodin E.N. *, Vekhnovskay E.G.
Bashkir State Agricultural University, Ufa, Russia
*skovorodinen@mail.ru

Abstract. The spinal ganglia of laboratory animals and humans have been studied in some detail. There is not enough information about the development of these organs in chickens and they were carried out mainly on embryos. The aim of the study was to study the morphological manifestations of the patterns of adaptive restructuring of the elements of the nervous tissue of the sensitive link of the reflex arc in postembryonic ontogenesis and depending on the varying degree of motor activity of chickens. The object of the study was chickens from the daily to 180-day-old age. The experimental group, unlike the control group, received dosed forced movement. Spinal ganglia of the lumbar region were extracted and fixed. The method of silver impregnation was used, stained with hematoxylin and eosin. Tigroid substance was detected by the Nissl method. Nucleoproteins were detected by the Einarson method, and the content of nucleic acids in neurons and gliocytes was evaluated using a cytophotometer. Succinate dehydrogenase activity was evaluated using nitro-CT. Electron microscopy was performed according to a generally accepted technique. In chickens, significant specific features of the spinal ganglia were revealed: the ganglia are combined with the sympathetic

chain; they contain diffuse or nodular clusters of lymphocytes; neurons are arranged in rows, mainly along the periphery of the ganglion; the main process of neurons has a rectilinear course; the nuclei of nerve cells contain more often two large nucleoli; the basophilic substance varies in structure and localization, can be represented by small, large lumps arranged evenly, or forming a cellular pattern, or concentrated mainly on the periphery of the neuron. Neurons differ in cytoplasm density, number, characteristics and distribution of organelles. The final differentiation of neurons and other ganglion structures is not completed by the time of hatching and continues until 150 days of postembryonic development, by the beginning of puberty. Neuron-glial relations in postembryonic ontogenesis become more complicated. This is expressed in the thickening of the mantle shell, an increase in the number of satellites, the volume of their nuclei, the size and number of appendages of the cytoplasm, an increase in the number of nucleic acids and the activity of SDG in it. Gliocytes are characterized by varying degrees of development of synthetic, transport and energy systems. The size of protrusions and invaginations of cytoplasm of neurons and satellites is growing. The spinal ganglia of chickens raised in a poultry farm using metered forced movement, unlike the control group, are characterized by a smaller relative number of medium neurons, an average volume of nerve cell bodies and their growth rate, a large nuclear-plasma ratio, an average volume of satellite nuclei, SDH activity and the number of nucleic acids in neurons and gliocytes.

Keywords: dorsal root ganglion; chicken; neurons; satellite cells

Введение

Пристальное внимание исследователей привлекают спинномозговые узлы, нейроны которых являются начальным звеном рефлекторных дуг от экстеро-, интеро- и проприорецепторов [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Их состояние отражает процессы, протекающие в организме при возрастной и адаптационной изменчивости. Спинномозговые ганглии лабораторных животных и человека изучены довольно подробно на разных стадиях пре- и постнатального онтогенеза, а также при экспериментальных воздействиях [7, 8]. Сведений о видовой специфике развития этих органов у кур недостаточно и эти исследования, главным образом, проводились на эмбрионах с помощью светового микроскопа [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Целью исследования было изучить морфологические проявления закономерностей адаптивной перестройки элементов нервной ткани чувствительного звена рефлекторной дуги в постэмбриональном онтогенезе и в зависимости от разной степени

двигательной активности кур.

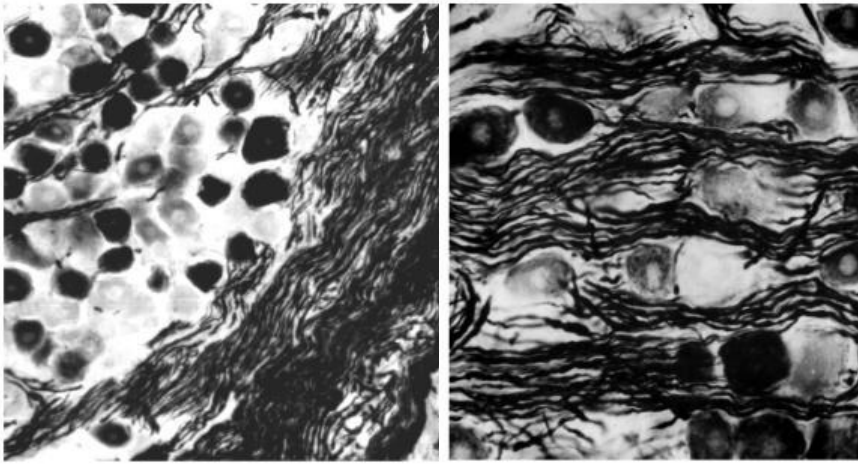
Материалы и методы

Работа проводилась на кафедре морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней Башкирского ГАУ, на птицефабрике и в личном подсобном хозяйстве. Объектом исследования служили куры, которые были разделены на две группы: опытную и контрольную. Обе группы находились в одинаковых условиях клеточного содержания и кормления. Опытная группа, в отличии от контрольной, получала дозированное принудительное движение (ДПД) от 1 до 22 минут, в зависимости от возраста, три раза в день.

Исследованию подвергались куры 1, 15, 30, 60, 90, 150 и 180 суток. Кроме того, с целью уточнения некоторых деталей морфологии, были взяты спинномозговые ганглии поясничного отдела от кур 60-ти суточного возраста, выведенные и выращенные в условиях личного подсобного хозяйства. Всего было получено 346 спинномозговых ганглиев поясничного отдела, которые извлекали после декапитации, фиксировали для дальнейшей обработки. Применяли метод серебряной импрегнации по Бильшовскому-Грос, окрашивали гематоксилином и эозином. Тигроидное вещество выявляли методом Ниссля. Нуклеопротеиды выявляли методами Браше и Эйнарсона, с помощью цитофотометра оценивали содержание нуклеиновых кислот в нейронах и глиоцитах. Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) оценивали с помощью нитро-СТ по методу Нахласа. Электронную микроскопию проводили по общепринятой методике.

Результаты и их обсуждение

Спинномозговые ганглии (СМГ) поясничного отдела кур макроскопически выражены, они лежат за пределами позвоночного канала, на границе слияния дорсальных и вентральных корешков спинного мозга. Вблизи вентральной поверхности ганглиев расположена симпатическая цепочка. При гистологическом исследовании мы обнаружили, что ганглии совмещены с узлами симпатической цепочки и имеют общую капсулу и разделены нервными волокнами. Чувствительные и симпатические нейроны разделены толстым пуком нервных волокон (рис. 1А). Ряд авторов [16, 17, 18] также отмечали совмещение спинальных и симпатических ганглиев грудного отдела у птиц других видов.



А **В**

Рис. 1. СМГ курицы. Импрегнация по Бильшовскому-Грос. **А.** Возраст 60 суток. Нервные волокна, разделяющие спинномозговой и симпатические узлы. Ув. 100. **В.** Суточный цыпленок. Тела нейронов, расположенные рядами и разделенные пучками нервных волокон. Ув. 200.

Спинномозговые ганглии кур поясничного отдела представлены телами нервных клеток, их отростками, сателлитами мантийной оболочки, слабо развитой соединительнотканной стромой. Соединительнотканная капсула, покрывающая ганглий, тонкая и внутрь органа отдает тонкие прослойки, между которыми расположены элементы нервной ткани. Нами впервые в составе спинномозговых ганглиев кур обнаружена лимфоидная ткань. Находясь обычно в периферических зонах узла, она представлена большими, средними, малыми лимфоцитами, тканевыми базофилами, плазматическими клетками. Лимфоидная ткань может располагаться диффузно или в виде узелков. Последние, начиная с 30-ти суточного возраста преобладают в последующие периоды. Подобные образования в других органах кур описаны и расцениваются как норма [19]. Мы не отмечали существенных отличий в структуре этих образований у птиц, содержащихся в условиях птицефабрики и у кур, выведенных в личном подсобном хозяйстве. Описанный нами факт может быть использован при выяснении малоизученных вопросов взаимоотношений нервной и иммунной систем.

У всех исследованных нами кур тела чувствительных нейронов

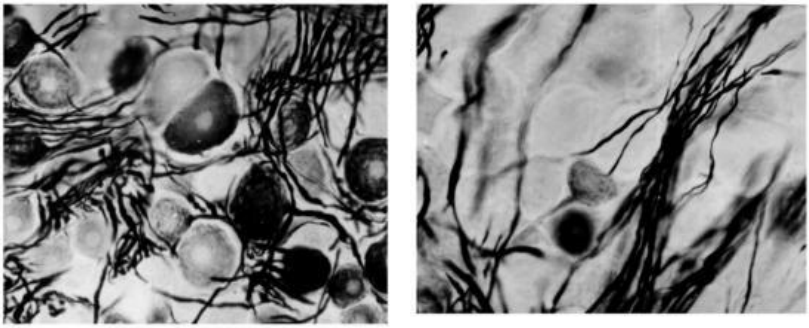
лежат в основном по периферии, а в центральной части идут пучки нервных волокон. В тоже время, у млекопитающих ганглии имеют более или менее дольчатое строение и перикарионы в их располагаются группами. Это отражает закономерное изменение распределения перикарионов от диспергированного до концентрированного типа в филогенезе, а также перемещение их к периферии в онтогенезе, более выраженное у высших животных [4, 5].

В отличие от млекопитающих нейроны ганглиев кур лежат рядами, разделенными пучками нервных волокон (рис. 1В). От тел нейронов обычно отходит один, довольно толстый отросток (рис. 2А). Кроме униполярных и псевдоуниполярных нейронов встречаются типичные биполярные клетки, у которых наряду с толстым основным отростком виден тонкий, имеющий вариации в отхождении (рис. 2В). Кроме перечисленных форм нейронов в спинномозговых ганглиях кур мы наблюдали мультиполярные нейроны. Мы рассматриваем эти клетки как атипичные, реактивно измененные, так как не встречали их у цыплят в начале постэмбрионального онтогенеза. Кроме того, нельзя отрицать возможность смещения части вегетативных нейронов в эмбриональный период.

По А.Н. Северцеву [20] гистогенез псевдоуниполярных нейронов идет путем надставки («анаболии») новых структурных черт к конечным стадиям морфогенеза. Так, у рыб спинномозговые узлы содержат, главным образом биполярные нейроны. У кур мы наблюдали преобладание униполярных и псевдоуниполярных нейронов, а также небольшое количество биполярных клеток. Таким образом, нейронный состав спинномозговых узлов птиц близок к таковому у млекопитающих [4, 5].

Перикарионы нейронов характеризуются существенными различиями в импрегнации. Мы различали аргентофильные, гипераргентофильные, аргентофобные, а также тонкие аргентофильные нейроны с аргентофобной периферией и аргентофобные клетки с аргентофильной периферией (рис. 2А). Малые, средние и большие нейроны обладают разными аргентофильными свойствами.

Базофильное вещество у нейронов хорошо развито и имеет вид мелкой или крупной зернистости, распределенной диффузно или образующей ячеистый рисунок. Интенсивность окраски базофильного вещества нейронов не адекватна количеству нуклеиновых кислот, определяемого цитофотометрически. Нейроны спинномозговых ганглиев кур содержат большое количество этих веществ, которое увеличивается с возрастом. Эти факты подтверждаются с помощью электронно-микроскопического исследования.



А **В**

Рис. 2 СМУ курицы. Импрегнация по Бильшовскому-Грос. **А.** Возраст 15 суток. Разная степень импрегнации униполярных нейронов. Ув. 100. **В.** Возраст 15 суток. Биполярный нейрон. Ув. 200.

Белоксинтезирующая функция в цитоплазме нейронов тесно связана с окислительно-восстановительными процессами. В цикле Кребса-Эмбдема-Миергофа наиболее чувствительной характеристикой митохондрий, при действии на организм даже незначительных физиологических нагрузок, является фермент сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Активность СДГ в нейронах варьирует, поэтому среди нервных клеток можно видеть перикарионы с низкой, средней и высокой активностью СДГ, что не зависит от их величины (рис. 3). В цитоплазме нейронов находятся участки с высокой и низкой плотностью распределения продукта реакции. Это более выражено в крупных нейронах. Сателлиты мантийной оболочки характеризуются более низкой по сравнению с нейронами активностью СДГ. В нервных волокнах гранулы диформазана в незначительном количестве откладываются неравномерно по длине волокон, что придает им четкообразный вид.

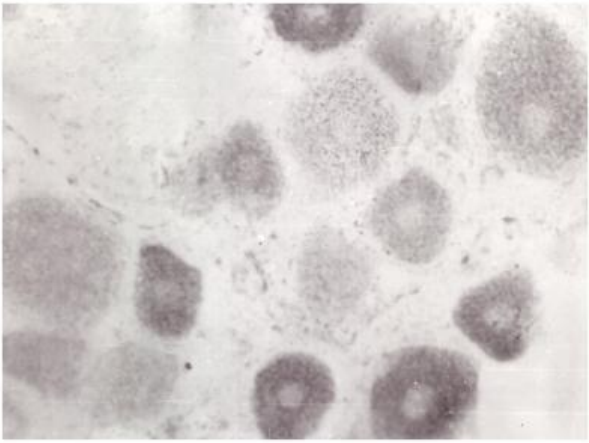


Рис. 3. СМГ курицы. 90 суток. Гранулы диформазана в участках наличия СДГ. Гистоэнзимологическая реакция с нитро-СТ по Нахласу. Ув. 200.

Это подтверждается с помощью электронно-микроскопического исследования. Обнаружили, что митохондрии находятся в различных морфофункциональных состояниях. Характерна неравномерность их распределения в нейроплазме и гетерогенность в различных нейронах, что является морфологическим эквивалентом разного уровня аэробного окисления и в частности активности СДГ.

У всех исследованных птиц в ганглиях мы наблюдали небольшое количество нейронов и нервных волокон с приспособительными и патологическими изменениями (хроматолиз, смещение ядра, гиперхроматоз ядра, перинуклеарный отек, вакуолизация нейронов, тигролиз, «клетки-тени» и остаточные тельца, варикозная деформация волокон, феномен Перрончито, зернистый распад волокон). Необходимо отметить, что измененные нейроны чаще встречаются у суточных, 60-ти и 90-то суточных цыплят. Тогда как, количество измененных волокон с возрастом увеличивается. Это связано с функциональными и возрастными изменениями в организме, с происходящей в нервной ткани перестройкой концевых аппаратов (дегенерация рецепторов в эпидермисе, изменения синапсов на нейронах и других тканях, апоптозе), которые не могут не влиять на состояние нейронов [10, 21, 22].

Электронно-микроскопически нами установлены значительные различия в ультраструктурной организации нервных клеток. Для

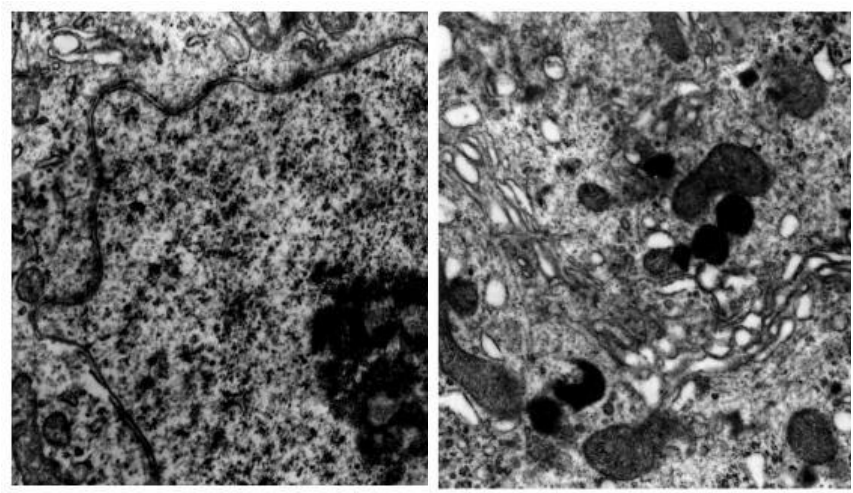
нейронов первой разновидности характерно крупное округлое ядро с одним или несколькими ядрышками (рис. 4А). Цитоплазма содержит обилие органелл. В перинуклеарной зоне располагаются рибосомы, полисомы и небольшое количество коротких профилей гранулярного ретикулума. Митохондрий в этой зоне много, они имеют округлую, овальную или палочковидную форму. Нейрофиламенты и нейротубулы в перинуклеарной зоне цитоплазмы лежат поодиночке или формируют пучки различной толщины. Основная масса цитоплазма представлена глыбками Ниссля. Они образованы плотно расположенными рибосомами, полисомами и небольшим количеством коротких профилей гранулярного ретикулума. Комплекс Гольджи хорошо развит (рис. 4В). Он может располагаться в разных участках клетки и состоит из параллельно расположенных цистерн, макро- и микропузырьков. Некоторые профили диктиосомы расширены. Вблизи пластинчатого комплекса могут лежать лизосомы различной величины и формы. Нейроплазма, прилегающая к плазмолемме содержит небольшое количество рибосом и полисом, нейрофиламентов, нейротубул и митохондрий.

Нейроны второй разновидности имеют ядра, контуры которых часто неровные. Расширенное перинуклеарное пространство может переходить в короткие профили гранулярного ретикулума перинуклеарной зоны нейрона. Глыбки базофильного вещества образованы сравнительно большим количеством длинных, чаще широких профилей гранулярного ретикулума, ориентированных параллельно или в разных направлениях (рис. 5А). Количество свободных рибосом и полисом незначительно. Структуры пластинчатого комплекса умеренно и реже сильно расширены. Плазмолемма нейрона неровная и образует выпячивания, расположенные между отростками сателлитов (рис. 5В).

Встречаются нейроны, имеющие сходство с клетками первой и второй разновидностей: их цитоплазма по составу и структуре, напоминает клетки первой разновидности, однако профили гранулярного ретикулума имеют большую длину и некоторые слегка расширены. Такие нейроны мы относили к промежуточным формам. Данные световой микроскопии позволяют считать это обоснованным.

Сравнивая с другими видами животных можно отметить, что по структуре базофильного вещества птицы занимают как бы промежуточное положение между низшими позвоночными (для которых характерно небольшое количество рибосом, полисом, особенно связанных с мембранами, отсутствие однотипной направленности профилей гранулярного ретикулума) и

млекопитающими, у которых много рибосом, большая часть которых собрана в полисомы и связана с мембранами, профили гранулярного ретикулума длинные, идут параллельно, отмечается разнообразие перикарионов по ультраструктуре [23, 24].



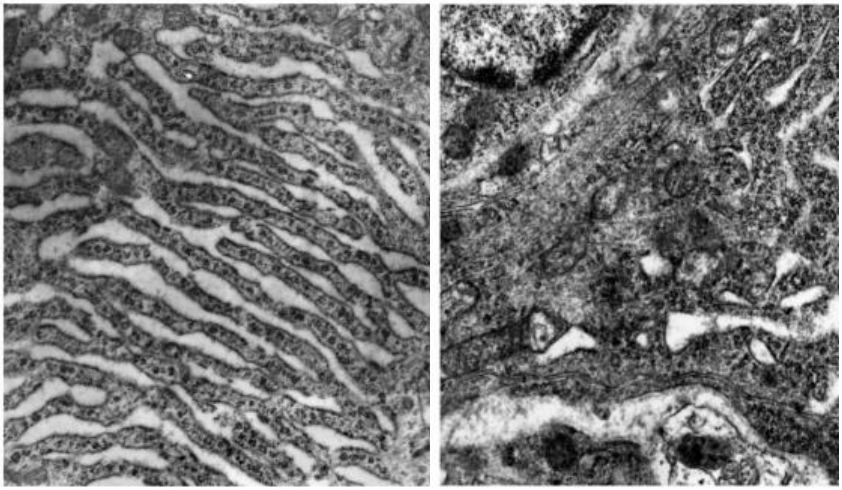
А **В**

Рис. 4. Электронная микрофотография. А. 30 суток. Нейрона I разновидности. Ядро с ретикулярным ядрышком. Ув. 10 000. В. 150 суток. Участок цитоплазмы нейрона I разновидности. Комплекс Гольджи. Ув. 10 000.

Что касается разновидностей нейронов по их ультраструктуре, мы расцениваем их как нейроны, имеющие разную функциональную активность. Это заключение согласуется с данными других исследователей, изучавших ультраструктуру нейронов у лабораторных и сельскохозяйственных животных [4, 17, 23, 25].

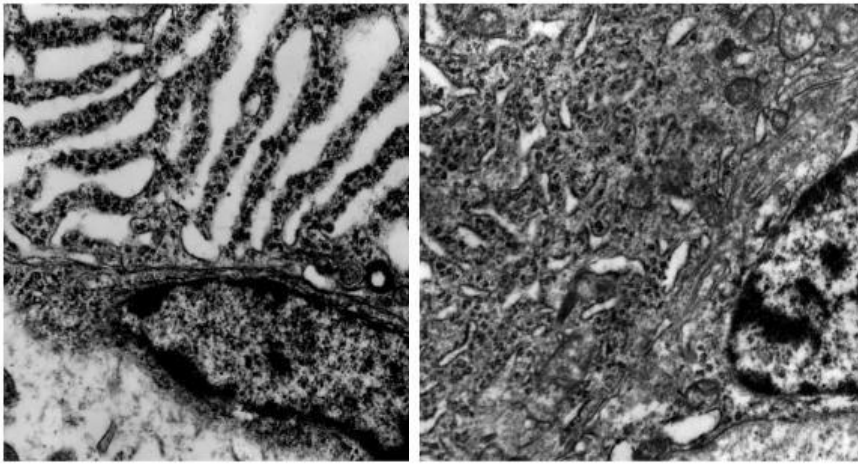
Тела нейронов окружены мантийной оболочкой, состоящей из сателлитов. Они имеют небольшие размеры и светооптически об их наличии можно судить лишь по ядрам. В среднем число сателлитов окружающих тело нейрона - 1,32 … 4,97. Сателлиты имеют отросчатую форму. Ядра их преимущественно овальные, располагаются в центре клетки (рис. 6А и 6В). Ядрышко представлено в основном гранулярным компонентом, лежит в центре или около ядерной мембраны. Встречаются сателлиты с двумя или тремя

ядрышками. Цитоплазм глиоцитов распределена вокруг ядра равномерно. У полюсов или на одной из его поверхностей масса цитоплазмы увеличена. Здесь сосредоточены органеллы: рибосомы, полисомы, цитоплазматическая сеть, митохондрии, пластинчатый комплекс, протофиламенты, лизосомы. Остальные зоны ядра окружены узким слоем цитоплазмы, содержащей в основном рибосомы, полисомы, микрофиламенты. Сателлиты мантийной оболочки нейрона по строению ядра, состоянию митохондрий, белоксинтезирующей системы сильно варьируют, что может свидетельствовать об их разной функциональной активности.



А **В**

Рис. 5. Электронная микрофотография. **А.** 150 суток. Глыбки базофильного вещества нейрона II разновидности. Ув. 10 000. **В.** Суточный цыпленок. Переход цитоплазмы нейрона II разновидности в основной отросток. Ув. 10 000.



А **В**

Рис. 6. Электронная микрофотография. **А.** Суточный цыпленок. Периферия цитоплазмы нейрона II разновидности, нейрон-глиальные взаимоотношения. Ув. 10 000. **В.** 60 суток. Нейрон-глиальные взаимоотношения. Ув. 10 000.

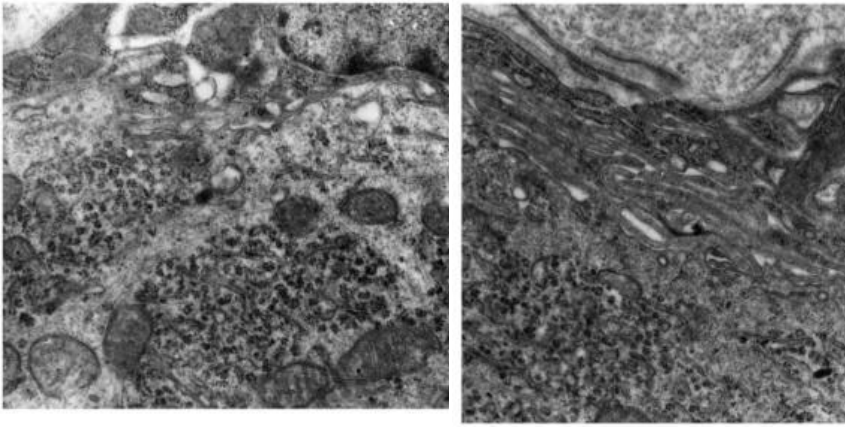
Отростки сателлитов, перекрывая друг друга, контактируют с отростками соседних клеток, образуя таким образом, сплошную капсулу вокруг перикариона. Небольшие цитоплазматические отростки нейронов могут располагаться среди переплетающихся отростков глиальных клеток. На границе с межклеточным веществом поверхность сателлитов может быть относительно ровной или образовывать небольшие отростки. Снаружи мантийная оболочка покрыта базальной мембраной, которая в раннем возрасте выражена плохо.

Нейрон всегда окружен глией и связан с ней функционально в своеобразный симбиотический комплекс. В процессе эволюции отмечено усложнение нейрон-глиальных отношений [23, 26, 27, 28, 29]. По нашим данным, у кур в постнатальном онтогенезе нейроны ганглия покрыты относительно тонкой глиальной оболочкой. Её сателлиты всегда имеют отросчатую форму, длина отростков их взаимоотношения с возрастом увеличиваются (рис. 7А и 7В).

Нервные проводники спинномозговых ганглиев представлены миелиновыми и безмиелиновыми волокнами, которые лежат между телами нейронов и образуют пучки разные по диаметру. На протяжении некоторых волокон имеются варикозные расширения и

деструктивные изменения в виде зернистого распада (рис. 8А, 8В, 8С). Варикозные расширения можно отнести к приспособительным изменениям, количество которых у исследованных нами кур с возрастом увеличивается. Феномен реактивной варикозной деформации был известен еще первым гистологам и история его исследования поучительна своими противоречиями [15, 21]. Было показано, во-первых, что это не посмертный артефакт. Во-вторых, доказано, что отсутствует связь с физико-химическими процессами, имеющими место при фиксации. Варикозная деформация является ранней, легко обратимой, неспецифической реакцией живых нейронов на нарушение гомеостаза и наблюдается у представителей пресмыкающихся, земноводных, рыб, птиц, у которых носит те же закономерности, что и у млекопитающих [30]. С помощью электронного микроскопа мы находили расщепление миелиновой оболочки и отслоение ее от осевого цилиндра.

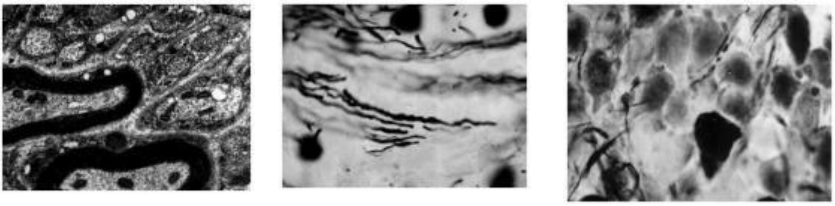
К моменту вылупления окончательная дифференциация структур, составляющих спинномозговые ганглии, не завершена (рис. 1В, 5В, 6А, 8В, 8С) и интенсивно протекает в ранний и последующий периоды постэмбрионального развития. С возрастом происходит увеличение размеров узлов, снижается плотность расположения тел нейронов за счет утолщения мантийной оболочки и отростков нервных клеток, дифференциации соединительной ткани. Объем тел нейронов увеличивается до 150-ти суточного возраста и составляет в контрольной группе 25592$\pm$245,27 мкм^3. При этом у кур опытной группы, получавшей дозированное принудительное движение, этот показатель несколько ниже (23758,10$\pm$311,86 мкм^3). В первые 15 суток, когда происходит адаптация к условиям внешней среды, интенсивный рост, скорость роста объема тел нейронов у опытной группы меньше (в 1,09 раза), чем в контроле (в 1,26 раза). В дальнейшем эти показатели выравниваются. Наибольший рост нейронов отмечен с 15-ти до 30-ти суток, когда завершается рост ювенального оперения и начинается постепенная замена его вторичным, интенсивно растут мышцы, увеличивается количество двигательных и проприорецептивных окончаний.



А **В**

Рис. 7. Электронная микрофотография. **А.** 150 суток. Цитоплазма нейрона I разновидности, нейрон-глиальные взаимоотношения. Ув. 10 000. **В.** 180 суток. Усложнение нейрон-глиальные взаимоотношений. Ув. 10 000.

Ядерно-плазматическое отношение с возрастом снижается во всех типах нейронов приблизительно на 46%. У птиц, содержащихся с применением ДПД, ядерно-плазматическое отношение несколько больше, но достоверные различия наблюдали с 90 суточного возраста (0,043 в контрольной группе и 0,049 – в опытной).



А **В** **С**

Рис. 8. СМГ куриц. **А.** Электронная микрофотография. Возраст 180 суток. Миелиновые и безмиелиновые волокна. Ув. 10 000. **В.** Суточный цыпленок. Варикозные расширения волокон. Импрегнация по Бильшовскому-Грос. Ув. 200. **С.** Суточный цыпленок. Зернистый распад нервных волокон. Импрегнация по Бильшовскому-Грос. Ув. 400.

Распределение базофильного вещества меняется следующим образом. Происходит укрупнение глыбок субстанции Ниссля. Число перикарионов с преимущественно периферической локализацией уменьшается, сначала в больших, затем – в средних и к 180-ти суткам такое распределение встречается только в единичных нейроцитах малой величины. В процессе дифференцировки в больших нейронах преобладающим является ячеистый рисунок тигроида. Различия по степени импрегнации солями серебра сохраняются на всем протяжении постнатального развития, но число гипераргентофильных и аргентофобных нейронов уменьшается к 180-ти суточному возрасту. Количество нуклеиновых кислот в нейронах с возрастом увеличивается. Этот процесс интенсивно протекает в первые 15 суток. У кур, выращенных с применением ДПД, количество нуклеиновых кислот в нейронах достоверно больше, чем в контроле (при $P<0,05$) и в первые 15 суток отмечен более резкий подъем. Двухфакторный дисперсионный анализ свидетельствует том, что возрастные изменения сильнее выражены в нейронах средней величины (51%), а меньше в больших (39%). ДПД существенно влияет на содержание нуклеиновых кислот в малых нейронах и слабее на количество их в больших. Это можно объяснить развитием популяции нейронов спинномозговых ганглиев, связанных с проприорецепторами, которые имеют меньшую величину.

Анализ активности СДГ в спинномозговых ганглиях в постнатальном онтогенезе позволил установить, что концентрация продукта реакции в нейронах увеличивается до 90 суточного возраста, но более заметно в первые 30 суток после вылупления. В дальнейшем, к 150-ти суточному возрасту, активность фермента снижается и остается на том же уровне к 180-ти суткам. В опытной группе активность фермента в перикарионах несколько выше, чем в контроле. Разница более выражена в 30-ти суточном возрасте. В обеих группах с возрастом становится более выраженной неравномерность распределения гранул диформазана в нейроплазме: увеличивается величина участков, в которых отсутствуют гранулы, а в зонах где они присутствуют возрастает плотность залегания (рис. 3).

Электронно-микроскопически установлено, что дифференцировка спинномозговых ганглиев после вылупления выражается в увеличении неровностей ядерной оболочки, развитии базофильного вещества, цитоскелета. Расширяется перинуклеарная зона нейроплазмы, утолщаются пучки нейрофиламентов и нейротубул, увеличивается число митохондрий, растет количество лизосом, развивается пластинчатый комплекс. Плазмолемма нейронов с

возрастом образует более крупные выросты и инвагинаты. Для ультраструктурных компонентов спинномозговых ганглиев опытной группы характерны менее выраженные морфологические перестройки в критические периоды (90 и 180 суток), что свидетельствует о большей адаптивной способности компонентов ганглия (рис. 7В, 8А).

Происходит развитие мантийной оболочки. Количество сателлитов и средний объем их ядер положительно коррелирует с величиной тела нейрона, которое они окружают. У мелких и средних нейронов ядра сателлитов растут быстрее в первые 15 суток, а у больших – во второй месяц постэмбрионального развития. Средний объем ядер сателлитов у кур, получавших ДПД несколько больше чем в контроле (достоверная разница отмечена в 90 и 150-ти суточном возрасте при $P<0,05$). Количество нуклеиновых кислот в глиоцитах достоверно повышается с возрастом на 85% ($P<0,05$). Особенно интенсивно этот процесс идет во втором месяце постэмбрионального развития. У кур опытной группы количество нуклеиновых кислот в глиоцитах достоверно (при $P<0,05$) больше, чем в контроле, начиная с 30-ти суточного возраста.

Активность СДГ в мантийной оболочке с возрастом растет, особенно интенсивно во второй месяц. Активность фермента повышается до 90 суточного возраста, затем снижается к 150-ти суткам и остается на том же уровне к 180-ти суткам – к моменту завершения роста вторичного оперения, процесса окостенения скелета, полового созревания, началу яйцекладки.

Электронно-микроскопический анализ показал, что мантийная оболочка утолщается, растет плотность расположения в ней сателлитов (рис. 7А и 7В). Увеличивается количество глиоцитов с расширенными перинуклеарными пространствами и профилями гранулярного ретикулума. Возрастает отростчатость сателлитов. Их отростки образуют сложные переплетения между собой, формируя в эндоневральном пространстве своеобразную сеть. С возрастом происходит рост активности СДГ в нервных волокнах. Становится более выраженным их четкообразный вид. Миелинизация нейритов завершается и чаще встречаются их деструктивные изменения.

На основании сопоставлений результатов собственных исследований и данных литературы, мы убедились, что сложная структурно-метаболическая перестройка спинномозговых ганглиев кур в постэмбриональном онтогенезе направлена на обеспечение адекватных связей с внешней средой и обусловлена не только генетическими факторами, но и механизмами адаптации к меняющимся условиям, функционирующими на уровне целого

организма.

Выводы

1 У кур, как представителей класса позвоночных, имеющих существенные биологические отличия, выявлены видовые особенности структурной организации спинномозговых ганглиев поясничного отдела по сравнению с млекопитающими: ганглии совмещены с симпатической цепочкой; содержат в своем составе диффузные или узелковые скопления лимфоцитов; нейроны располагаются рядами, в основном по периферии ганглия; основной отросток нейронов имеет прямолинейный ход; ядра нервных клеток содержат чаще два крупных ядрышка; базофильная субстанция варьирует по строению и локализации, может быть представлена мелкими, крупными глыбками расположенными равномерно, или образующим ячеистый рисунок, или сконцентрированными преимущественно на периферии нейрона.

2 Электронно-микроскопическими исследованиями показано, что нейроны различаются по плотности цитоплазмы, количеству, характеристике и распределению органелл: аппарата синтеза белка, нейрофиламентов, нейротубул.

3 Окончательная дифференциация нейронов и других структур ганглия к моменту вылупления не завершена и продолжается, в основном, до 150-ти суток постэмбрионального развития, к началу полового созревания.

4 Нейрон-глиальные отношения в постэмбриональном онтогенезе усложняются. Это выражается в утолщении мантийной оболочки, увеличении количества сателлитов, объема их ядер, размеров и отростчатости цитоплазмы, увеличении количества нуклеиновых кислот и активности СДГ в ней. Глиоциты характеризуются разной степенью развития синтетических, транспортных и энергетических систем. Растет величина выступов и инвагинаций плазмолемм нейронов и сателлитов.

5 Спинномозговые ганглии кур, выращенных на птицефабрике с применением дозированного принудительного движения, в отличии от контрольной группы характеризуются меньшим относительным количеством средних нейронов, средним объемом тел нервных клеток и скоростью их роста, большим ядерно-плазматическим отношением, средним объемом ядер сателлитов, активностью СДГ и количеством нуклеиновых кислот в нейронах и глиоцитах.

Все эксперименты были проведены в соответствии с законодательством Российской Федерации (Закон РФ "О ветеринарии"; Уголовный кодекс Российской Федерации. Статья 245. «Жестокое

обращение с животными»; Приказ министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных») и с учетом Европейской конвенции по защите домашних животных (Council of Europe – ETS no. 125 – European Convention for the Protection of Pet Animals).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Papka R.E. Sensory Ganglia // Encyclopedia of Neuroscience. 2009. Pp. 657 - 668.
2. Marani E. Dorsal Root Spinal Ganglion // The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. 2016. Pp. 1020 - 1025.
3. Clarke C., Lemon R. Nervous System Structure and Function // Neurology: A Queen Square Textbook: Second Edition, 2016. Pp. 11-673.
4. Emery E., Ernfors P. Dorsal Root Ganglion Neuron Types and their Functional Specialization // The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain. 2018. Pp. 129-155.
5. Vermeiren, S. Bellefroid E., Desiderio S. Vertebrate Sensory Ganglia: Common and Divergent Features of the Transcriptional Programs Generating Their Functional Specialization // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020. Vol. 826. Article number 587699.
6. Ma Q. A functional subdivision within the somatosensory system and its implications for pain research // Neuron. 2022. Vol. 110. No. 5. Pp. 749 - 7692.
7. Kanno T., Espreafico E., Chao Y. Role of Myosin Va in Neuritogenesis of Chick Dorsal Root Ganglia Nociceptive Neurons // Cell Biology International. 2014. Vol. 38. No. 3. Pp. 388 - 394.
8. Shekarabi M., Robinson J., Burdo T. Isolation and Culture of Dorsal Root Ganglia (DRG) from Rodents / M. Shekarabi, // Methods in Molecular Biology. 2021. Vol. 2311. Pp. 177-184.
9. Bononi, J. Cole A., Tewson P., Schumacher A., Bradley R. Chicken protocadherin-1 functions to localize neural crest cells to the dorsal root ganglia during PNS formation // Mechanisms of Development. 2008. Vol. 125, No. 11-12. Pp. 1033 - 1047.
10. Fang L., Wang Y.-N., Cui X-L., Fang S-Y., Ge J-Y., Sun Y., Liu Z-H. The role and mechanism of action of activin A in neurite outgrowth of chicken embryonic dorsal root ganglia // Journal of Cell Science. 2012. Vol. 125. No. 6. Pp. 1500-1507.

11. Lin J., Redies C. Expression of delta-protocadherins in the spinal cord of the chicken embryo // Journal of Comparative Neurology, 2012. Vol. 520. No. 7. Pp. 1509 - 15311.
12. Redies C. , Sharp A.A., Fedorovich Y. Teratogenic effects of pyridoxine on the spinal cord and dorsal root ganglia of embryonic chickens // Neuroscience. 2015. Vol. 289. No. 9. Pp. 233 - 241.
13. Keynes R., Cook G. Segmentation of the Chick Central and Peripheral Nervous Systems // International Journal of Developmental Biology. 2018. Vol. 62. No. 1-3. Pp. 173 – 178.
14. Shurygina, L.V. Zlishcheva E.I., Kravtsov A.A., Kozin S.V. Neurotrophic Effect of Magnesium Comenate in Normal and under Conditions of Oxidative Stress in Culture of Chicken Spinal Ganglia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021. Vol. 171, No. 3. Pp. 338 - 341.
15. Sun, Y. Wu Y-J. Tri-ortho-cresyl phosphate induces axonal degeneration in chicken DRG neurons by the NAD+ pathway // Toxicology Letters. 2022. Vol. 363, P. 77 - 84.
16. Соловьев А.А. Эволюционная морфология спинномозговых узлов: автореф. дис. … канд. мед. наук. Ижевск, 1973. 19 с.
17. Махмуд Селим А.А. Гистохимический и электронномикроскопический анализ симпатических ганглиев пограничного ствола кур в постнатальном онтогенезе: автореф. дис. … канд. вет. наук. М., 1979. 14 с.
18. Стрижиков В.К., Стрижикова С.В., Пономарева Т.А., Гизатуллина Ф.Г., Сытько В.В. Сравнительная морфологическая характеристика плечевого и пояснично-крестцового сплетений птиц // Актуальные вопросы ветеринарных и сельскохозяйственных наук. Челябинск, 2021. С. 72-81.
19. Tahseen A.-A., Barnes H.J., Shivaprasad H.L., Swayne D.E. Avian Histopathology. 4th edition. – American Association of Avian Pathologists, 2016. 664 p.
20. Северцев А.Н. Главные направления эволюционного процесса. М., 1935.135 с.
21. Cesmebasi A. Anatomy of the Dorsal Root Ganglion // Nerves and Nerve Injuries. 2015. Vol. 1. No. 23. Pp. 471 - 476.
22. Hanig J., Negi G. Myelin: Structure, Function, Pathology and Targeted Therapeutics // Handbook of Developmental Neurotoxicology. 2018. Pp.33-521.
23. Pannese E. Neurocytology: Fine Structure of Neurons, Nerve Processes, and Neuroglial Cells: Second Fully Revised and Updated Edition. 2015. Pp. 1–319

24. Хохлова С.Н., Симанова Н.Г., Богданова М.А., Степочкин А.А., Фасахутдинова А.Н. Некоторые закономерности морфогенеза нейроцитов домашних млекопитающих и птиц // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. № 4-1 (58). С. 41-47.
25. Vesin M.-F., Droz B. Immunodetection of Prostaglandin D Synthase: Conditions of Localization in a Defined Subclass of Primary Sensory Neurons // Journal of Histochemistry and Cytochemistrythis link is disabled. 1995. Vol. 43(7). Pp. 681–687.
26. Pannese E. Biology and Pathology of Perineuronal Satellite Cells in Sensory Ganglia // Advances in Anatomy Embryology and Cell Biologythis link is disabled. 2018. Vol. 226. Pp. 1–63.
27. Pannese E. Quantitative, Structural and Molecular Changes in Neuroglia of Aging Mammals: A review // European Journal of Histochemistrythis link is disabled. 2021. Vol. 65(S1). P. 3249.
28. Verkhratsky A., Ho M.S., Parpura V. Evolution of Neuroglia // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2019. Vol. 1175. Pp. 15-44.
29. Rahman, S. Adolescent opioid abuse: Role of glial and neuroimmune mechanisms / S. Rahman, Z. Rahman, P.J. Ronan, K. Lutfy, R.L. Bell // International Review of Neurobiology, 2022. Vol. 161. Pp. 147-165.
30. Sotnikov O.S. Binucleated and Multinucleated Neurons are Formed by Fusion // Bulletin of Experimental Biology and Medicinethis Link is Disabled. 2021. Vol. 171(4). Pp. 508–512

© Сковородин Е.Н., Вехновская Е.Г., 2022

УДК: 616.8-00, 616.8-003.98
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.28

ИЗМЕНЕНИЯ РЕАКТИВНОГО ПРОФИЛЯ АСТРОЦИТОВ ПЕРЕДНЕГО КОРТИКАЛЬНОГО ЯДРА АМИГДАЛЫ У КРЫС С АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ В ОТВЕТ НА ГОНАДЭКТОМИЮ

© Файрушина А.И.*, Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р.
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»,
г. Уфа, Россия
* adelia_ildarovna@mail.ru

Аннотация. Методом иммуногистохимического маркирования на глиальный фибриллярный кислый белок были исследованы процессы пролиферации и морфоструктурной организации астроцитов в переднем кортикальном ядре амигдалы у крыс обоего пола до и после гонадэктомии на фоне врожденной абсансной эпилепсии. Выявлены прогрессивно-пролиферативные изменения на экспериментально смоделированный дефицит половых гормонов. Полученные результаты позволяют считать, что маркирование на глиальный фибриллярный кислый белок может использоваться в дальнейших исследованиях патогенеза абсансной эпилепсии в корреляции с деятельностью репродуктивной системы.

Ключевые слова: абсансная эпилепсия, гонадэктомия, GFAP, *амигдала, крысы линии WAG/Rij, астроциты.*

CHANGES OF THE ASTROCYTES' REACTIVE PROFILE OF THE ANTERIOR CORTICAL NUCLEUS OF THE AMYGDALA IN RATS WITH ABSENSE EPILEPSY IN RESPONSE TO GONADECTOMY

Fairushina A.I.*, Sadrtdinova I.I., Khismatullina Z.R.
Bashkir State University, Ufa, Russia
* adelia_ildarovna@mail.ru

Abstract. Proliferation and morphostructural organization of astrocytes in the anterior cortical nucleus of the amygdala were studied in rats of both sexes before and after gonadectomy incase of congenital absence epilepsy. For this purpose, we used the method of

immunohistochemical labeling for glial fibrillar acidic protein. Progressive proliferative changes in the experimentally modeled deficiency of sex hormones were revealed. The results obtained suggest that labeling for glial fibrillar acidic protein can be used in further studies of the pathogenesis of absence epilepsy in correlation with the activity of the reproductive system.

Key words: absence epilepsy, gonadectomy, GFAP, amygdala, WAG/Rij rats, astrocytes.

Введение

В последние годы все чаще проводятся исследования об участии половых гормонов в деятельности нейронов и нейроглии головного мозга, что рассматривается в рамках нейроиммуноэндокринологии. Глиальные клетки являются иммунными клетками мозга, и в случае повреждения нервной ткани глия приобретает реактивный фенотип [1;2]. В процессах нейровоспаления и нейропротекции важное значение отводится астроцитарной глии [3]. Показано, что астроциты являются иммунокомпетентными клетками, способными реагировать на изменения концентрации цитокинов и хемокинов, а также активировать некоторые адаптивные иммунные реакции [4;5]. В активированном состоянии астроциты могут оказывать значимое воздействие на микроокружение нейронов, в частности они способны модулировать их выживаемость [6].

Изменение или потеря астроцитами своей морфологической структуры, традиционно считающаяся признаком реактивного астроглиоза, являются общей патологической особенностью для многих неврологических расстройств [7], в том числе при эпилепсии.

В последние годы активно изучается содержание и экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в астроцитах, так как он участвует в процессе митоза астроцитов, что имеет ключевое значение при повреждениях мозга любого происхождения. Отмечено значительное повышение уровня GFAP при острых воспалительных заболеваниях головного мозга, болезнях Альцгеймера и Паркинсона, а также эпилепсии [8]. Имеются данные, что эпилепсия коррелирует с нарушениями половой системы, поэтому у пациентов обоих полов часто наблюдаются репродуктивная и сексуальная дисфункции [9].

На ростральном полюсе кортикомедиального отдела миндалевидного комплекса (амигдалы, далее МК) находится важный нейроэндокринный центр – переднее кортикальное ядро (далее COa), который считается «зоной полового диморфизма».

Анализ ультраструктурных характеристик нейронов и синапсоархитектоники МК у крыс выявил предопределенные полом

различия [10;11]. Половой диморфизм показан и для астроцитов амигдалы [12], принимающих участие в формировании отростков нервных клеток. При этом следует отметить работы последних лет, в которой показано, что рецепторы к половым гормонам экспрессируются не только в нейронах, но и в астроцитах МК [13;14].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы стало исследование реактивных изменений астроцитов переднего кортикального ядра амигдалы у крыс с абсансной эпилепсией в ответ на гонадэктомию.

Материалы и методы

Объектом исследования стали 6-месячные крысы линии WAG/Rij обоего пола, разделенные на 4 группы по 6 животных в каждой: контрольные самки, контрольные самцы, опытные самки и опытные самцы. Контрольные группы составили ложнооперированные животные. В опытных группах обоих полов была проведена гонадэктомия под эфирным наркозом по общепринятой методике. Животные были выращены в стандартных условиях вивария кафедры физиологии и общей биологии Башкирского государственного университета. Работа с лабораторными животными, а также выведение их из эксперимента проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Срезы для иммуногистохимии (парафиновые, толщина 4 мкм) изготавливали на микротоме LeicaRM 2145 (Германия). Далее их окрашивали на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) с использованием мышиных моноклональных антител по протоколу производителя (SantaCruzBiotechnology) в иммуногистостейнере (LeicaMicrosystems BOND TM, Германия). Клеточные ядра докрашивали гематоксилином.

Визуализация полученных препаратов проводилась с применением светооптического микроскопа Микмед-6 (ЛОМО, Россия) при увеличении в 400 раз (окуляр 10, объектив 40) и цифровой камеры Levenhuk M1000 PLUS (разрешение 10 МП).

Результаты и обсуждение

В ходе иммуногистохимического исследования СОа МК мозга [15; 16] нами были обнаружены астроциты, экспрессирующие GFAP во всех исследуемых нами группах, однако, эта экспрессия имела разный характер.

Большинство астроцитов в СОа МК контрольной группы самок имели звездчатую форму (рис. 1А): от тела астроцитов радиально отходили тонкие, сильно ветвящиеся основные отростки. Они не имели четких контуров и прокрашивались намного слабее по сравнению с телами.

У самцов контрольной гуппы большинство астроцитов имели треугольную, веретенообразную или округлую форму, звездчатые формы клеток встречались единично (рис. 1В). Контуры тел и основных отростков были четкими, определялось незначительное количество основных стволовых отростков от 1 до 3 в зависимости от формы клетки. Периферические отростки были тонкими и менее выраженными по сравнению с отростками астроцитов самок.

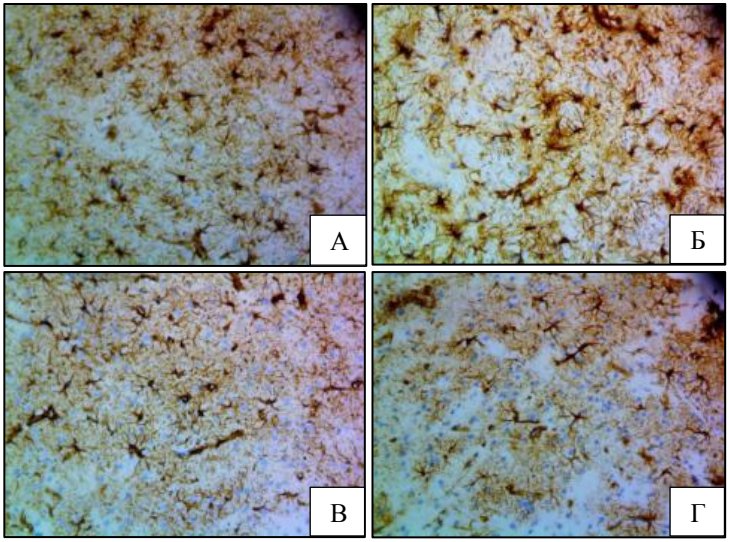


Рис. 1. Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (коричневый цвет) в СОа МК мозга крыс линии WAG/Rij. Непрямой иммунопероксидазный метод, подкраска гематоксилином. х400. Обозначения: А – контрольная группа самок, Б – опытная группа самок, В – контрольная группа самцов, Г – опытная группа самцов.

При визуальном анализе препаратов мы обратили внимание на размеры астроцитов: у самок они были крупнее, чем у самцов. Это отличие обуславливается расположением клеток относительно друг друга и морфологией астроцитарных отростков. У самок они выражены сильнее, достигают соседних клеток и создают

своеобразную волокнистую «сеть», заполняющую все пространство между телами. У самцов клетки располагаются более разрозненно и отростки в некоторых зонах не перекрываются соседними.

У самок после гонадэктомии (рис. 1Б) большинство астроцитов сохраняли свою звездчатую форму. Однако наблюдалась нечеткость и расплывчатость клеточных границ, что проявлялось в виде диффузного разрастания и разволокнения как основных стволовых, так и тончайших периферических отростков.

По распределению антител к GFAP в СОа опытных групп было видно, что отростки маркируются красителем сильнее, что говорит об усилении экспресии GFAP. Кроме того, после овариоэктомии визуализировалось резкое увеличение количества GFAP-позитивных астроцитов в сравнении с контрольной группой.

Астроциты самцов после гонадэктомии, наоборот, приобретали форму, близкую к звездчатой (рис. 1Г): количество стволовых отростков в среднем варьировало от 3 до 5. Это указывает на повышение функциональной активности астроцитов, так как они меняют свою форму на звездчатую только при активном контакте с соседними клетками [17]. Отчетливо наблюдалось изменение и в морфологии тончайших периферических отростков астроцитов, которые образуют близкие расположения к синапсам [18].

Клеточные ядра в опытных группах визуализировались плохо, что, вероятно, связано с усиленной экспрессией GFAP в цитоплазме.

Таким образом, иммуногистохимическое выявление глиального фибриллярного кислого белка в СОа указывает на то, что астроциты как самок, так и самцов крыс линии WAG/Rij активно реагируют на экспериментально вызванный дефицит половых гормонов. Все морфофункциональные перестройки в атроцитах сопровождаются изменением степени экспрессии GFAP.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Литература

1. Schwartz M., Butovsky O., Brück W., Hanisch U.-K. Microglial phenotype: is the commitment reversible? // Trends in Neurosciences. 2006. V. 29(2). P. 68–74. DOI: 10.1016/j.tins.2005.12.005.

2. Hanisch U.-K., Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain // Nature Neuroscience. 2007. V. 10(11). P. 1387–1394. DOI: 10.1038/nn1997

3. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology // Acta Neuropathol. 2010. V.119(1). P. 7–35.

4. Philips T., Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease // The Lancet Neurology. 2011. V. 10(3). P. 253–263. DOI: 10.1016/s1474-4422(11)70015-1.

5. Никифорова Т.А., Песков С.А. Доронина О.Б. Анализ современного состояния клинико-экспериментальных данных о взаимодействии нервной и иммунной систем // Бюллетень сибирской медицины. 2014. Т. 13. № 6. С. 72–80.

6. Li C., Zhao R., Gao K., Wei Z., Yin M. Y., Lau L. T., Chui D., Yu A. C. H. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease //Current Alzheimer Research. 2011. V. 8(1). P. 67–80. DOI: 10.2174/156720511794604543.

7. Zhou B, Zuo YX, Jiang RT. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases // CNS Neurosci Ther. 2019. 25(6). P. 665-673. doi: 10.1111/cns.13123

8. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В. Иммуногистохимическое исследование головного мозга / Под. ред. Коржевского Д.Э. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2013. – 143 с.

9. Авакян Г.Н., Бадалян О.Л, Крикова Е.В., Чуканова А.С., Бурд С.Г. Репродуктивные нарушения у мужчин с эпилепсией// Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2010. №1. Т.2. С.30-36.

10. Akhmadeev A.V., Kalimullina L.B. Electron-microscopic characteristics of neuroendocrine neurons in the amygdaloid body of the brain in male rats and female rats at different stages of the estral cycle // Neurosci Behav Physiol. 2008. V. 38. № 1. P.31–35.

11. Brunton P.J., Donadio M.V., Russell J.A. Sex differences in prenatally programmed anxiety behaviour in rats: differential corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the amygdaloid complex // Stress. 2011. Vol. 14. № 6. P. 634–643.

12. Rasia-Filho A.A., dos Santos P., Gehlen G., Achaval M. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreativity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats // Brain Res Bull. 2002. Vol. 58. № 1. P. 67–75.

13. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс как нейроэндокринный репродуктивный центр мозга: фундаментальные закономерности структурно-функциональной организации как основа для развития прикладных разработок и новых инновационных технологий // Научное обозрение (Медицинские науки). 2016. № 6. С. 15-31.

14. Johnson R.T., Schneider A., DonCarlos L.L., Breedlove S.M., Jordan C.L. Astrocytes in the rat medial amygdala are responsive to adult androgens // J Comp Neurol. 2012. Vol.520. № 11. P. 2531–2544.

15. Файрушина А.И., Денисова В.В., Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р. Экспрессия глиального кислого фибриллярного белка в астроцитах переднего кортикального ядра миндалевидного тела мозга крыс// Морфология. 2019. Т. 155. № 2. С. 292.

16. Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р. Реактивные изменения астроцитов миндалевидного тела головного мозга в ответ на разный уровень половых гормонов при абсансной эпилепсии// Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018. Т. 118. № 10-2. С. 61-66.

17. Денисова В.В., Файрушина А.И., Хисматуллина З.Р., Сартдинова И.И. Влияние дефицита тестостерона на морфологию и количество астроцитов миндалевидного комплекса мозга крыс с абсанс-эпилепсией // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2019. №3 (43). С.79-82. DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10042

18. Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits // Nat Neurosci. 2015. 18(7). P. 942-952.

© Файрушина А.И., Садртдинова И.И.,
Хисматуллина З.Р., 2022

УДК: 612.821
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.29

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА В АНТЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

©Федорова А.М.[*], Давлетбаева А.Р., Хисматуллина З.Р.
Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия
albinamfedorova@mail.ru

Аннотация. Целью исследования явилось: изучить эмоционально-двигательное поведение крысят в период постнатального развития, подвергавшихся пероральному введению нанодисперсной формы TiO2 в дозе 10 мг/кг в антенатальный период. В эксперименте участвовали 40 крысят в возрасте от 0 до 90 дней. Крысята были получены от 14 самок крыс Non-linear albino, массой 170-210 г, поделенных рандомно на группы «контроль» и «опыт». Животным контрольной группы (n=6) один раз в сутки с 1-го по 20-й день беременности вводили перорально дистиллированную воду в объеме 1 мл. Животным опытной группы (n=8) также один раз в сутки вводили перорально суспензию наночастиц TiO2 [60-80 нм] в дозе 10 мг/кг. Для выявления эмбриотоксического воздействия наночастиц диоксида титана на показатели поведения крысят в постнатальный период развития крыс использовали установку «открытое поле». Тестирование проводили в стандартных условиях освещенности в течение 5 минут на 40-45 дни развития. При этом регистрировались следующие поведенческие показатели: горизонтальная и вертикальная активность, латентный период выхода из центра, число актов груминга и количество актов дефекаций. Исследование эмоционально-двигательного поведения крысят в период постнатального развития, подвергавшихся пероральному введению нанодисперсной формы TiO2 в дозе 10 мг/кг в антенатальный период показало, что наночастицы TiO2 обладают выраженными эмбриотоксическими свойствами и затормаживают развитие рефлексов у потомства крыс, что выражается в том, что опытная группа крыс достоверно меньше проявляла вертикальную и горизонтальную активность по сравнению с контрольной группой животных.

Ключевые слова: поведение, крысы, наночастицы, диоксид титана, открытое поле.

STUDY OF EMOTIONAL AND MOTOR BEHAVIOR OF RATS UNDER INFLUENCE OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES IN THE ANTENATAL PERIOD OF DEVELOPMENT

©Fedorova A.M.*, Davletbaeva A.R., Khismatullina Z.R.
Bashkir State University, Ufa, Russia
albinamfedorova@mail.ru

Abstract. The aim of the study was: to study the emotional-motor behavior of rat pups in the period of postnatal development, subjected to oral administration of a nanodispersed form of TiO2 at a dose of 10 mg/kg in the antenatal period. The experiment involved 40 rat pups aged from 0 to 90 days. Rats were obtained from 14 female Non-linear albino rats, weighing 170-210 g, divided randomly into groups "control" and "experiment". Animals of the control group (n=6) once a day from the 1st to the 20th day of pregnancy were administered orally distilled water in a volume of 1 ml. Animals of the experimental group (n=8) were also administered orally once a day with a suspension of TiO2 nanoparticles [60-80 nm] at a dose of 10 mg/kg. To identify the embryotoxic effect of titanium dioxide nanoparticles on the behavior of rat pups in the postnatal period of development of rats, an "open field" setup was used. Testing was carried out under standard lighting conditions for 5 minutes on days 40-45 of development. At the same time, the following behavioral indicators were recorded: horizontal and vertical activity, the latent period of leaving the center, the number of grooming acts and the number of defecation acts. A study of the emotional and motor behavior of rat pups during postnatal development, subjected to oral administration of a nanodispersed form of TiO2 at a dose of 10 mg/kg in the antenatal period, showed that TiO2 nanoparticles have pronounced embryotoxic properties and inhibit the development of reflexes in the offspring of rats, which is expressed in the fact that the experimental the group of rats showed significantly less vertical and horizontal activity compared to the control group of animals.

Key words: behavior, rats, nanoparticles, titanium dioxide, open field.

Введение

Опубликованные исследования последних лет о влиянии наночастиц диоксида титана (НЧ TiO2) на грызунов показывают, что

они могут проникать через эпителиальные ткани (такие как назальный, бронхиальный, альвеолярный и желудочно-кишечный тракт) и легко поступать в кровоток [6]. Из-за возможности НЧ проникать в организм через дыхательные пути, возникает проблема их транслокации в мозг напрямую через обонятельный путь или косвенно посредством прохождения через гематоэнцефалический барьер. Например, НЧ размером 36 нм были обнаружены в обонятельной луковице крыс после их интерназального введения [8]. Также транслокация НЧ золота в мозг наблюдалась в модели их воздействия на крыс [14], а НЧ иридия размером 15–20 нм были обнаружены в мозге крыс через 6 месяцев после ингаляционного воздействия [11]. Несмотря на эти наблюдения, влияние НЧ на ЦНС в реальных условиях воздействия окружающей среды или на рабочем месте еще не полностью изучено. Немногочисленные на сегодняшний день отчеты показывают повышенный окислительный стресс, активацию воспалительных ответов, модуляцию уровней нейромедиаторов в головном мозге и нарушение пространственного распознавания, связанное с присутствием НЧ титана в головном мозге [16]. Кроме того, недавние данные нескольких исследований показывают, что воздействие загрязненного воздуха, содержащего мелкие частицы, может увеличить риск смертельного инсульта, вызвать цереброваскулярное повреждение и нейровоспалительные процессы, которые могут вызвать нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера и Паркинсона [9, 10].

Кроме этого, широкое использование наноматериалов вызывает опасения по поводу негативного воздействия НЧ на репродуктивную систему человека, а также на здоровье плода, так как небольшие размеры НЧ и биосовместимость дают им возможность проникновения через плацентраный барьер [11, 12]. Способность выводить токсины в организме эмбрионов низка, поскольку развивающийся эмбрион не имеет механизмов защиты обратной связи [4,5] и может быть более чувствительным к воздействию НЧ TiO2 по сравнению со зрелыми организмами. В последнее время значительное внимание привлекло воздействие искусственных НЧ на беременных крыс [12]. Было предположено, что воздействие НЧ TiO2 на беременных самок может приводить к нарушениям в развитии эмбриона и плода, особенно на нормальное развитие и функционирование ЦНС. Однако информация о пероральном всасывании НЧ TiO2 и их выведении из тканей через более длительные периоды времени в доступной литературе ограничена.

Целью исследования явилось: изучить эмоционально-двигательное поведение крысят в период постнатального развития, подвергавшихся пероральному введению нанодисперсной формы TiO2 в дозе 10 мг/кг в антенатальный период.

Материал и методы исследования

В эксперименте участвовали 40 крысят в возрасте от 0 до 90 дней. Крысята были получены от 14 самок крыс Non-linear albino, массой 170-210 г, поделенных рандомно на группы «контроль» и «опыт». Животным контрольной группы (n=6) один раз в сутки с 1-го по 20-й день беременности вводили перорально дистиллированную воду в объеме 1 мл. Животным опытной группы (n=8) также один раз в сутки вводили перорально суспензию наночастиц TiO2 [60-80 нм] в дозе 10 мг/кг. Крысы содержались в условиях вивария кафедры физиологии и общей биологии Башкирского государственного университета, характеризующийся постоянством комнатной температуры (20-22°С) и уровнем влажности. При работе с крысами полностью соблюдались международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (2000 год).

Тест «открытое поле» является одним из старейших классических методов. Данный метод тестирования разработан К. Холлом для оценки общей активности, а также исследовательского поведения испытуемых животных. Тест основан на конфликте двух мотиваций - инстинктивной тенденции к исследованию нового окружения и тенденции минимизировать возможную опасность со стороны такового. Это является информативной методикой, позволяющей адекватно оценивать нейротропные эффекты повреждающих факторов окружающей среды [1]. При разделении поля на зоны, обычно выделяется две области – периферическая зона, непосредственно граничащая со стенками установки, и центральная зона, также при исследовании учитывают «среднее кольцо» [2].

Для выявления эмбриотоксического влияния наночастиц диоксида титана на показатели поведения крысят в постанатальный период развития крыс использовали установку «открытое поле». Тестирование проводили в стандартных условиях освещенности в течение 5 минут на 40-45 дни развития. При этом регистрировались следующие поведенческие показатели: горизонтальная и вертикальная активность, латентный период выхода из центра, число актов груминга и количество актов дефекаций.

Результаты исследования и обсуждение

С самого рождения крысы начинают развитие своих поведенческих особенностей: приобретают навыки адаптации, необходимые для выживания. Все поведенческие особенности принято разделять на инстинкты, присутствующие с рождения, и навыки, которые крыса приобретает в течении жизни, такие как навыки социализации. Одним из главной составной поведенческого акта - двигательная активность, исследовательская деятельность, груминг и т.д. Когда мы помещаем животное в новую обстановку он испытывает естественную тревожность, присущую всем организмам, которая чаще всего выражается в замирании, но по истечению времени его исследовательское любопытство берет вверх, и он начинает двигательную активность.

Тест «открытое поле» дает оценить выраженность и динамику типовых поведенческих актов у крыс в стрессовых условиях, вызванными в ответ на перемещение лабораторного животного в установку, имеющую большую площадь и интенсивность освещения, чем повседневные условия содержания в клетке. Чаще всего «открытое поле» применяется как скрининговый тест. Он может быть использован в токсикологических исследованиях для обнаружения минимальных нарушений в организме животного, вызываемых токсическими агентами [7].

При исследовании эмоционального статуса подопытных животных по методу «открытое поле» на 40 день жизни было выявлено, что потомство от крыс, подвергавшихся пероральному введению НЧ TiO2 ежедневно в течение всей беременности в дозе 10 мг/кг проявляла значительно меньшую вертикальную активность, чем контрольная группа. В среднем количество стоек группы «опыт» составила - 7,43±3,91 стоек, «контроль» - 11,00±5,23 стоек. Так же отмечено, что время пребывания на периферии крысят опытной группы составило 87,47±19,33 сек., что значительно больше аналогичного показателя контрольной группы - 63,79±23,47 сек (Табл. 1).

Таблица 1. Показатели ориентировочно-исследовательского поведения нелинейных крыс на 40 день постнатального развития в тесте «открытое поле» на фоне воздействия наночастиц диоксида титана в антенатальный период

Показатели ОП	Опыт	Контроль
Латентный период выхода из центра, сек.	0,86±0,66	0,64±0,50
Число пересеченных квадратов, шт.	54,14±23,40	53,62±18,57
Число стоек, шт.	7,43±3,91*	11,00±5,23
Груминг, шт.	2,92±2,09	1,86±0,95
Болюсы, шт.	0,29±0,83	0,00±0,00
Время проведенное на периферии, сек	87,47±19,33*	63,79±23,47

Примечание: * – обозначены значимые различия при сравнении контрольной и опытной групп в тесте Манни-Уитни, $p < 0,05$

На 41 день жизни крысята опытной группы также больше времени проводили на периферии, чем крысята контрольной группы. Кроме этого, произошел рост показателя «груминг» опытной группы и составил - 3,86±1,99 шт., что значительно выше показателя контрольной группы - 1,57±1,22 шт.

На 43 день было отмечено только значительное различие в вертикальной активности. Количество стоек крысят опытной группы в среднем составило 6,78±3,55, а контрольной - 10,79±4,42 (табл. 2).

Таблица 2. Показатели ориентировочно-исследовательского поведения нелинейных крыс на 43 день постнатального развития в тесте «Открытое поле» на фоне воздействия наночастиц диоксида титана в антенатальный период

Показатели ОП	Опыт	Контроль
Латентный период выхода из центра, сек.	0,35±0,63*	1,50±0,94
Число пересеченных квадратов, шт.	51,07±31,39	61,00±20,78
Число стоек, шт.	6,78±3,55*	10,79±4,42
Груминг, шт.	3,42±3,11	2,00±1,41
Болюсы, шт.	0,14±0,36	0,07±0,27
Время проведенное на периферии, сек	92,57±12,76	84,57±16,37

Примечание: * – обозначены значимые различия при сравнении контрольной и опытной групп в тесте Манни-Уитни, $p < 0,05$

На 44 день крысят опытной группы значительно больше времени проводили на периферии области «открытого поля», что составило в среднем 87,33±20,01 сек., а у контрольной группы - 59,50±19,77 сек.

На 45 день значимые различия отмечены только в показателе «латентный период выхода из центра». Крысята опытной группы выходили из центра в среднем через 0,31±0,63 сек., а контрольной через 1,21±1,19 сек. (табл. 3).

Таблица 3. Показатели ориентировочно-исследовательского поведения нелинейных крыс на 45 день постнатального развития в тесте «Открытое поле» на фоне воздействия наночастиц диоксида титана в антенатальный период

Показатели ОИП	Опыт	Контроль
Латентный период выхода из центра, сек.	0,31±0,63*	1,21±1,19
Число пересеченных квадратов, шт.	43,77±17,89	45,43±17,02
Число стоек, шт.	9,00±8,53	8,93±8,53
Груминг, шт.	1,69±1,11	2,43±1,01
Болюсы, шт.	0,07±0,28	0,00±0,00
Время проведенное на периферии, сек	75,08±22,01	65,21±28,26

Примечание: * – обозначены значимые различия при сравнении контрольной и опытной групп в тесте Манни-Уитни, $p < 0,05$

Также был проведен корреляционный анализ, который выявил, что в контрольной группе в течение всего периода наблюдений отмечается тенденция к зависимому росту между латентным периодом выхода из центра и числом груминга; вместе с вертикальной активностью растет горизонтальная. В то время как у опытной группы корреляция и рост наблюдается между показателями: латентный период выхода из центра и число стоек, что в свою очередь влияет на время пребывания на периферии.

При изучении эффектов влияния НЧ TiO_2 на живые организмы следует учитывать их способность накапливаться в организме [60], отчего могут возникнуть отсроченные во времени морфофункциональные изменения от воздействия этих соединений. Как уже было сказано выше, НЧ в целом и в частности НЧ TiO_2 обладают размерами, позволяющими им проходить через биологические барьеры. В доступной литературе имеются данные о влиянии НЧ TiO_2 на эмбрионы животных, посредством прохождения через плацентарный барьер [3], а также о прохождении НЧ TiO_2 через

гематоэнцефаллический барьер и их влиянии на центральную нервную систему (ЦНС) живых организмов [3-17]. По результатам нашего исследования можно предположить, что НЧ TiO2 обладают слабо выраженными эмбриотоксическими свойствами и затормаживают развитие рефлексов у потомства крыс, подвергавшихся пероральному введению НЧ TiO2 ежедневно в течение всей беременности в дозе 10 мг/кг.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Маркель, А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте открытого поля/ А.Л. Маркель // Журн. высш. нервн. деят. — 1981 - Т. 31, № 2 — С. 301-307.
2. Умрюхин, П.Е. Поведение в «открытом поле» и электрическая активность лимбических структур и коры мозга крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу / П.Е. Умрюхин // Журн. высш. нервн. деят. — 1996. - Т. 46, № 5. — С. 963-966.
3. Шарафутдинова Л.А., Хисматуллина З.Р., Даминов М.Р., Валиуллин В.В. Исследование эмбриотоксического действия наночастиц диоксида титана на крыс// Морфологические ведомости.- 2017.- Том 25.- № 3.- С. 37-42. https://doi.org/10.20340/mv-mn.17(25).03.37-42
4. Anderson L. M., Diwan B. A., Fear N. T., Roman E. Critical windows of exposure for children’s health: cancer in human epidemiological studies and neoplasms in experimental animal models. Environ Health Perspect. 2000; 108(Suppl 3):573–594.
5. Anderson L.M. Predictive values of traditional animal bioassay studies for human perinatal carcinogenesis risk determination. Toxicol Appl Pharmacol. 2004; 199(2):162–174.
6. Hong J, et al. Th2 Factors May Be Involved in TiO2 NP-Induced Hepatic Inflammation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014;62:6871–6878. doi: 10.1021/jf501428w.
7. N. Sestakova. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide / N. Sestakova [et al.] // Interdiscip. Toxicol. – 2013 Sep. – Vol. 6, N 3. – P. 126–135.
8. Oberdorster G., Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. Inhal Toxicol. 2004; 16:437–445.

9. Palacios, N. et al. Particulate matter and risk of parkinson disease in a large prospective study of women. Environmental Health13, doi:10.1186/1476-069x-13-80 (2014).
10. Peters A, et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. Particle and fibre toxicology. 2006; 3:13. doi: 10.1186/1743-8977-3-13.
11. Sharafutdinova L.A., Fedorova A.M., Bashkatov S.A., Sinel'nikov K.N., Valiullin V.V. Structural and functional analysis of the spermatogenic epithelium in rats exposed to titanium dioxide nanoparticles // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2018. T. 166. № 2. C. 279-282.
12. Semmler M, et al. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. Inhalation Toxicology. 2004; 16:453–459. doi: 10.1080/08958370490439650.
13. 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.
14. Xie G., Wang C, Sun J, Zhong G. Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles. Toxicol Lett. 2011; 205:55–61.
15. Yu L.E., et al. Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats. Nanotoxicology. 2007; 1:235–242. doi: 10.1080/17435390701763108.
16. 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.
17. Ze Y, et al. Neurotoxic characteristics of spatial recognition damage of the hippocampus in mice following subchronic peroral exposure to TiO2 nanoparticles. Journal of Hazardous Materials. 2014; 264:219–229. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.10.072.

©Федорова А.М., Давлетбаева А.Р., Хисматуллина З.Р., 2022

УДК: 611.81.018:599.323.4
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.30

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ КОННЕКСИНА 43

© Филиппов М.С.,[1]* Коржевский Д.Э.[2]
[1] Российский Государственный Педагогический Университет им. А. И. Герцена, г. Санкт-Петербург
[2] Институт Экспериментальной Медицины, г. Санкт-Петербург
* msfilippov@mail.ru

Аннотация. С растущим интересом научного сообщества к астроцитам, возникает потребность в разработке новых методов исследования этих клеток, позволяющих оценить их пространственные свойства и особенности межклеточного взаимодействия. Одно из таких свойств — способность объединяться в функциональные сети, называемые также астроцитарным синцитием, – позволяет им эффективно выполнять свои функции: депонировать и перераспределять ионы, сигнальные молекулы, питательные вещества и метаболиты нейронов. Внутриклеточной единицей, объединяющей астроциты в единую сеть, является щелевой контакт (macula communicans), состоящий из белков коннексинов. Специфическими для астроцитов являются коннексин 43, являющийся основным, и коннексин 30. Методом, получившим широкое признание в научной среде из-за своей наглядности и достоверности результата, является иммуногистохимическое исследование. Не смотря на широчайшее распространение, иммунохимические методы часто относят скорее к искусству, чем к ремеслу из-за сложностей воспроизведения существующих протоколов и разработки новых, а так же невозможности полностью стандартизировать работу с антителами. Данная работа посвящена разработке методики иммуногистохимического выявления коннексина 43 в головном мозге крысы. Представлен простой и воспроизводимый протокол иммуногистохимической реакции, позволяющий выявлять коннексин 43 на парафиновых срезах мозга крысы.

Ключевые слова: иммуногистохимия; коннексин 43; щелевой контакт; астроцит.

IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS FOR DETECTING CONNEXIN 43

Filippov M.S.,[1]* Korzhevskii D.E.[2]
[1] Herzen University, Saint-Petersburg
[2] Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg
* msfilippov@mail.ru

Abstract. With the growing interest of the scientific community focused to astrocytes, there is a need to develop new methods for studying these cells, allowing them to evaluate their spatial properties and subtleties of interaction. One of these properties is the ability to combine into functional networks, also called astrocytic syncytium, which allows them to effectively perform their functions: deposit and redistribute ions, signaling molecules, nutrients, and neuronal metabolites. The intracellular unit that unites astrocytes into a single network is the gap junction (macula communicans), which consists of connexin proteins. Specific for astrocytes are connexin 43, which is the main one, and connexin 30. The method that has received wide recognition in the scientific community due to its visibility and reliability of the result is immunohistochemical research. Despite the widest distribution, immunochemical methods are often considered more of an art than a craft due to the difficulties of reproducing existing protocols and developing new ones, as well as the inability to fully standardize work with antibodies. This research is devoted to the development of a technique for the immunohistochemical detection of connexin 43 in the rat brain. A simple and reproducible protocol for an immunohistochemical reaction is presented that allows the detection of connexin 43 on paraffin-embedded rat brain sections.

Keywords: immunohistochemistry; connexin 43; gap junction; astrocyte.

Введение

Коннексин 43 (Cx43) – трансмембранный протеин с молекулярной массой 43 кДа, состоящий из 382 аминокислот [1]. Ген GJA1 (gap junction protein, alpha 1), кодирующий Cx43, расположен на шестой хромосоме у человека [2] и на двадцатой хромосоме у крысы [3]. Этот протеин пронизывает мембрану четыре раза, и его N- и C-концы находятся в цитоплазме. C-концевой участок содержит сайты для связывания с элементами цитоскелета, транскрипционными факторами и другими протеинами [4].

Принадлежа к семейству коннексинов, Cx43 является составной частью щелевых контактов позвоночных. Шесть молекул коннексина формируют пору, проницаемую для ионов и малых молекул — коннексон, также незываемый гемиканалом. Два гемиканала, соединяющие две клетки, представляют собой щелевой контакт, называемый также нексусом или macula communicans [5]. Щелевой контакт способен пропускать через себя большинство молекул с массой менее 485 Да, важнейшими из которых являются ионы Ca^{2+} и K^{+}, инозитол трифосфат, глюкоза [6]. Таким образом, клетки, соединённые щелевым контактом, объединены электрохимически, сигнально и метаболически.

Cx43 – один из наиболее распространенных коннексинов [4]. Наиболее изучена его функция в кардиомиоцитах, где Cx43 играет ключевую роль в синхронизации сердечных сокращений [7]. Единую Ca^{2+}-проводящую сеть миокарда называют функциональным синцитием, подчёркивая функциональное единство объединённых щелевыми контактами клеток [8].

В ЦНС Cx43 является наиболее обильно экспрессируемым коннексином из-за астроцитарной специфичности [9]. Аналогично клеткам миокарда астроциты объединены щелевыми контактами между собой, образуя так называемый астроцитарный синцитий; с олигодендроцитами (интересно при этом, что олигоденроциты не объединены щелевыми контактами между собой непосрдественно, но только посредством астроцитов) и эпендимоцитами, составляя панглиальный синцитий. Из-за экспрессии различных коннексинов (Cx43 и Cx30), гетерогенные популяции астроцитов не объединены между собой и образуют несколько независимых сетей. [9, 10]. Нейроны, в свою очередь, изолированы от панглиального синцития благодаря использованию в щелевых контактах специфичного для этого типа клеток коннексина 36. Щелевые контакты между нейронами упоминаются в литературе как электрические синапсы [11].

Функциональная роль синцитиального объединения астроцитов является предметом обсуждения. Одна из важнейших функций астроцитов — ионный гомеостаз – осуществляется благодаря астроцитарному синцитию [12]. Другим свойством сети астроцитов является способность к проведению медленных дальнодействующих Ca2+-волн, которые возникают в ответ на нейрональную активность, и, в свою очередь, могут модулировать поведение нейронов, вызывая выброс различных нейромедиаторов. В последние годы широко описывается роль астроцитарного синцития в поведении. В своей обзорной статье Pannasch и Rouach показывают, что сеть щелевых

контактов благодаря способности к распределению ионов K+, Ca+, инозитол трифосфата, глюкозы и лактата принимает участие в физиологических процессах пространственной памяти, двигательной координации, тревоги, стресса и боли [13].

Одним из широко используемых методов для изучения внутриклеточных белков in situ является иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием специфичных к исследуемому белку антител. Для успешного осуществления ИГХ реакции необходим тщательный выбор антител, от качества которых зависит итоговый результат исследования.

Целью данной работы является разработка оптимальной методики для иммуногистохимическоговыявления Cx43 в головном мозге крысы.

Материалы и методы

Материал получен от половозрелых крыс-самцов Wistar. Эвтаназия проводилась в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном обращении с животными и приказом №755 МЗ СССР от 12.08.1977 «Правила проведения работ с использованием лабораторных животных. Образцы головного мозга зафиксированы в цинк-этанол-формальдегиде по методике Д.Э. Коржевского и соавт. [14] и залиты в парафин по общепринятой методике. Из блоков с помощью ротационного микротома изготовлены срезы толщиной 5 мкм. Обезвоженные срезы подвергли тепловому демаскированию [15]. Для иммуногистохимического окрашивания использовались мышиные антитела к коннексину 43 (Santa Cruz Biotechnology sc-271837, клон F-7) в разведении 1:100 и кроличьи поликлональные антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) RTU (Dako N1506) или 1:100 (Dako/Agilent Z0334). Вторичными реагентами были выбраны биотинилированные антитела к мышиным иммуноглобулинам (Vector Laboratories BA-9200), конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch #016-220-084) и Fab-фрагмент антикроличьего иммуноглобулина осла, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red-X (RRX) (Jackson ImmunoResearch #711-295-152). Визуализацию проводили при помощи конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 800 (Zeiss, Германия), морфометрические измерения – в программе ImageJ [16].

Результаты и обсуждение

Для обзора представленных на рынке антител против Cx43 были использованы сервисы Biocompare [17] и CiteAb [18]. При ранжировании упоминаемых в научных публикациях антител по количеству цитирований была составлена таблица (Табл.1).

Табл. 1. Антитела против Cx43, ранжированные по количеству упоминаний

Производитель	Каталожный номер	Клон	Носитель	Цитирований	Примечание
Sigma-Aldrich	C6219	поликлональн.	кролик	465	
Abcam	ab11370	поликлональн.	кролик	263	валидация нокаутом
Thermo Fisher Scientific	71-0700	поликлональн.	кролик	255	валидация анализом относительной экспрессии
Cell Signaling Technology	3512	поликлональн.	кролик	221	
Thermo Fisher Scientific	13-8300	CX-1B1	мышь	140	валидация нокаутом
Sigma-Aldrich	MAB3067	4E6.2	мышь	67	
Sigma-Aldrich	C8093	CXN-6	мышь	56	
Sigma-Aldrich	AB1728	поликлональн.	кролик	47	
Thermo Fisher Scientific	35-5000	3D8A5	мышь	40	

Santa Cruz Biotechnology	sc-271837	F-7	мышь	39	
Santa Cruz Biotechnology	sc-59949	CXN-6	мышь	37	
Proteintech	15386-1-AP	поликлональн.	кролик	37	
Abcam	ab79010	4E6.2	мышь	30	
Sigma-Aldrich	AB1727	поликлональн.	кролик	26	
Proteintech	26980-1-AP	поликлональн.	кролик	19	
Abcam	ab11369	CXN-6	мышь	18	
Abcam	ab87645	поликлональн.	коза	15	
Sigma-Aldrich	05-763	неизвестен	мышь	11	
Bioss	bs-0651R	поликлональн.	кролик	8	
Abcam	ab235585	EPR22955-101	кролик	7	
Sigma-Aldrich	SAB4501175	поликлональн.	кролик	6	
Alomone Labs	ACC-201	поликлональн.	кролик	5	
ECM Biosciences	CM4961	M496	мышь	2	
Thermo Fisher Scientific	138388	CX-1B1	мышь	1	
GeneTex	GTX11369	CXN-6	мышь	1	

Как видно из таблицы 1, наибольшей популярностью у исследователей пользуются поликлональные продукты производителей Sigma-Aldrich, Thermo Fischer Scientific и Abcam. Это объясняется их невысокой стоимостью в сравнении с моноклональными антителами, произведённой производителем валидацией для основных методов исследований и хорошим результатом их применения. Тем не менее, для ИГХ реакции in situ предпочтительными являются моноклональные антитела, поскольку при надлежащей подготовке препарата они проявляют меньшую кросс-реактивность и более низкий фон на препарате, а способ их производства подразумевает постоянство реактивности от партии к партии и известную «реактивность на массу антител» из-за однородности иммуноглобулинов в растворе моноклональных антител. Благодаря этим особенностям ИГХ реакцию с использованием моноклональных антител гораздо проще стандартизировать и воспроизвести [19].

Для производства моноклональных антител, пригодных для постановки ИГХ реакции на срезах мозга крысы, используются следующие клоны: CXN-6, 4E6.2, CX-1B1, 3D8A5, F-7, EPR22955-101 , M496, 3G107, 1C5.1, 3H9. Из более 50 подходящих антител были отобраны 10 лучших, демонстрирующих качественное окрашивание Cx43-содержащих структур в клетке и дающие наименьшее фоновое окрашивание (Табл. 2)

Табл. 2. Моноклональные антитела против Cx43, демонстрирующие высокое качество иммуногистохимической реакции

Производитель	Каталожный номер	Клон
Thermo Fischer Scientific	13-8300	CX-1B1
Thermo Fisher Scientific	35-5000	3D8A5
Abcam	ab79010	4E6.2
Abcam	ab11369	CXN-6
United States Biological	C7857	4E6.2
Sigma-Aldrich	C8093	CXN-6
Sigma-Aldrich	MAB3067	4E6.2
Sigma-Aldrich	SAB4200819	CXN-6
Santa Cruz Biotechnology	sc-271837	F-7
Santa Cruz Biotechnology	sc-59949	CXN-6

Для разработки протокола ИГХ-выявления Cx43 на срезах головного мозга крысы был выбран продукт Santa Cruz Biotechnology клон F-7, как хорошо зарекомендовавший себя в работе с объектами, залитыми в парафин.

Лучший результат был достигнут при соблюдении следующих условий:

1. Демаскирование депарафинированных срезов [15]

2. Инкубация с первичными мышиными антителами к коннексину 43 и кроличьими к GFAP в смеси 1:1 на протяжении 4 суток при 27,5°C.

3. Инкубация со вторичными реагентами – антикроличьи антитела с RRX (Jackson ImmunoResearch #711-295-152, разведение 1:25) на протяжении 90 минут, антимышиные биотинилированные антитела (Vector Laboratories BA-9200, разведение 1:200) на протяжении 120 минут при 27,5°C.

4. Инкубация с конъюгатом стрептавидина и Cy2 (разведение 1:150) на протяжении 40 минут при 27,5°C.

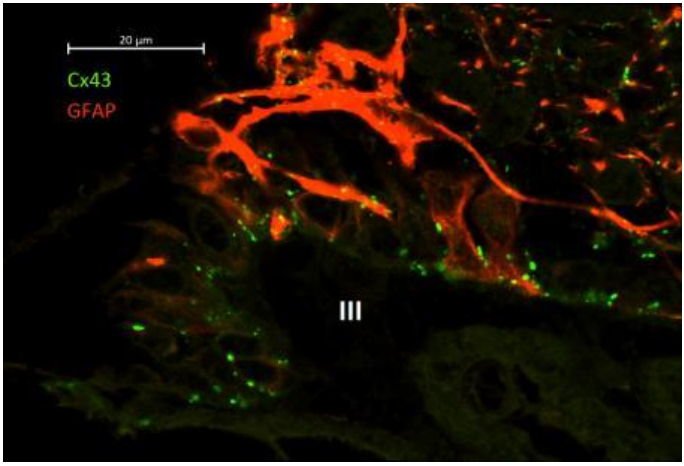


Рис 1. Участок эпендимы и субэпендимной области III желудочка головного мозга крсы. III – полость третьего желудочка.

Двойная иммуногистохимическая реакция на GFAP (визуализация при помощи флуорохрома RRX – красный цвет) и Коннексин 43 (визуализация при помощи флуорохрома Cy2 – зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия.

Полученное с помощью конфокального микроскопа изображение (рис. 1) демонстрирует чёткую локализацию белка интереса на срезе и низкий уровень фона. Коннексин 43 образует чётко различимые структуры размером до 2 мкм, расположенные на границах клеток – щелевые контакты. На прилегающей к желудочку поверхности эпендимоцитов обнаруживаются гемиканалы, связывающие цитоплазму этих клеток с внеклеточной средой. В соответствии с теоретическими данными [9,10,13], Cx43-позитивные щелевые контакты объединяют между собой прилегающие к полости желудочка эпендимоциты, а также GFAP-позитивные астроциты между собой.

Этические положения Протокол экспериментов одобрен Локальным этическим комитетом при ФГБНУ ИЭМ (протокол № 2/22 от 06.04.2022 г.)

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Uniprot P17302. URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P17302/entry. Дата обращения: 27.08.2022.
2. NCBI Gene ID 2697. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=2697. Дата обращения: 27.08.2022.
3. NCBI Gene ID 24392. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=24392. Дата обращения: 27.08.2022.
4. Laird D.W. Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations // FEBS Letters. 2014. 588(8). Pp. 1339–1348.
5. Cheung G., Chever O., Rouach N. Connexons and Pannexons: Newcomers in Neurophysiology // Frontiers in Cellular Neuroscience. 2014. 8:348. Pp. 1-19.
6. Hu X., Dahl G. Exchange of conductance and gating properties between gap junction hemichannels // FEBS Lett. 1999. 451(2). Pp. 113–117.
7. Delmar M., Makita N. Cardiac connexins, mutations and arrhythmias // Current Opinion in Cardiology. 2012. 27(3). Pp. 236–241.
8. Нормальная физиология человека. Учебник для ВУЗов / под ред. акад. РАМН Б.И.Ткаченко. М.: Медицина, 2005. 928 с.
9. Rash J.E., Yasumura T., Dudek F.E., Nagy J.I. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons // J Neurosci. 2001. 21. Pp. 1983–2000.

10. Orthmann-Murphy J.L., Abrams C.K., Scherer S.S. Gap Junctions Couple Astrocytes and Oligodendrocytes // Journal of Molecular Neuroscience. 2008. 35(1). Pp. 101–116.
11. Connors B.W., Long M.A. Electrical synapses in the mammalian brain // Annu Rev Neurosci. 2014. 27. Pp. 393–418.
12. Ma B., Buckalew R., Du Y., Kiyoshi C.M., Alford C.C., Wang W., McTigue D.M.,Enyeart J.J., Terman D., Zhou M. Gap junction coupling confers iso-potentiality on astrocyte syncytium // Glia. 2016. 64. Pp. 214-226.
13. Pannasch U., Rouach N. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior // Trends Neurosci. 2013. 36(7) Pp. 405-17.
14. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // Eur. J. Histochem. 2015. Vol. 59, No 3. Pp. 233-237.
15. Способ демаскирования антигенов при проведении иммуноцитохимических реакций / Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Алексеева О.С. Патент на изобретение RU 2719163 C1, 17.04.2020. Заявка № 2019137930 от 22.11.2019
16. Abramoff M.D., Magalhaes P.J., Ram S.J. Image Processing with ImageJ // Biophotonics International. 2004. 11(7). Pp. 36-42.
17. Citeab. URL: https://www.citeab.com/. Дата обращения 17.08.2022
18. Biocompare. URL: https://www.biocompare.com/. Дата обращения 17.08.2022
19. Иммуногистохимические методы: Руководство / Ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck.: DAKO / Пер. с англ. под ред. Г.А.Франка и П.Г.Малькова. – М., 2011. – 224 с.

© Филиппов М.С., Коржевский Д.Э., 2022

УДК 611.813.14: 616-007
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.31

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ CART-ПЕПТИДА В МИНДАЛЕВИДНОМ ТЕЛЕ МОЗГА КРЫС ЛИНИИ DAT-KO

©Хисматуллина З.Р., Садртдинова И.И.
Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия
hismatullinazr@mail.ru

Аннотация. В настоящем исследовании был проведён анализ экспрессии CART-пептида в структурах миндалевидного тела мозга крыс линии (модель дегенерации нервной системы). Результаты иммуногистохимического анализа показали достоверно повышенную концентрацию нейропептида в центральном ядре миндалевидного тела мозга у крыс линии DAT-KO по сравнению с крысами линии Wistar. Полученные данные позволяют предполагать, что указанная структура вовлечена в механизмы развития нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: CART-пептид; крысы линии DAT-KO; миндалевидное тело; нейродегенеративные заболевания.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE CART PEPTIDE IN THE AMYGDALA OF THE DAT-KO RATS

Khismatullina Z.R., Sadrtdinova I.I.
Bashkir State University, Ufa, Russia
hismatullinazr@mail.ru

In the present study, we analyzed the expression of the CART peptide in the structures of the amygdala of the brain of DAT-KO rats (model of nervous system degeneration). The results of immunohistochemical analysis showed a significantly increased concentration of the neuropeptide in the central nucleus of the amygdala in DAT-KO rats compared to Wistar rats. The data obtained suggest that this structure is involved in the mechanisms of development of neurodegenerative diseases.

Keywords: CART-peptide; DAT-KO rats; amygdala; neurodegenerative diseases.

Введение

CART - cocaine and amphetamine regulate transcript или кокаин-амфетаминовый регулируемый транскрипт – это пептидный нейротрансмиттер, который участвует во многих процессах регуляции организма, таких как питание и насыщение, механизме подкрепления и мотивации (в том числе и механизме возникновения зависимости), а также регулирует стресс [7]. Повышенные концентрации CART пептида найдены во многих отделах пищеварительной системы (ЖКТ, прямая кишка, поджелудочная железа), головного мозга (гипоталамо-гипофизарная система), спинного мозга и периферических вегетативных ганглиев. Есть современные данные об участии нейропептида в нейрогенезе, регенерации и бластомогенезе.

Миндалевидное тело (МТ) мозга, является нейроэндокринным центром, регулирующим деятельность множества физиологических процессов (работа внутренних органов, репродуктивной функции, адаптивного и пищевого поведения) и тесно связано с локализацией и функцией нейропептида. Особый интерес для проблемы, связанной с нейродегенеративными заболеваниями на базе системы катехоламинов, представляют структуры МТ. Большое количество исследований, связанных с формированием наркотической или алкогольной зависимости посвящены исследованию концентраций CART пептида в ядрах гипоталамуса и прилежащих к нему ядер, поскольку гипоталамо-гипофизарная система является центром формирования аддиктивных расстройств. МТ играет значимую роль в поведении страха и стрессовых реакциях в комплексе с кортикостероидами, что позволяет рассматривать нейропептид как элемент и эндокринной системы [1, 5, 6].

В настоящее время нейрохимия МТ мозга активно исследуется. В нервной ткани МТ обнаружено большое скопление различных ферментов и нейромедиаторов, включая дофамин и CART-пептид, регулирующих деятельность базовых систем организма. Однако, многие нейродегенеративные заболевания, такие как Синдром дефицита внимания и гиперактивности, болезнь Паркинсона, шизофрения и другие, имеют тенденцию к омоложению, чем обращают на себя большое внимание со стороны медицины, в то время как отделы МТ мозга все еще до конца не изучены морфологически в контексте нейропептида CART. Современные исследования сообщали о нейропротективной функции белка при различных повреждениях лимбической системы. Исследование МТ мозга при помощи генетической модели животных с патологией дофаминергической системы касательно этого свойства нейропептида, представляется

новой ступенью развития знаний о механизмах деятельности МТ при нейродегенеративных заболеваниях.

Цель исследования: установить закономерности экспрессии CART-пептида в структурах миндалевидного тела мозга крыс линии DAT-KO.

Материалы и методы

Исследование было проведено на крысах линии Wistar (контрольная группа, n=10) и линии DAT-KO (экспериментальная группа, n=10), которые характеризуются отсутствием гена обратного переносчика дофамина (SLC6A3), что проявляется в избыточной концентрации молекул дофамина в межклеточном пространстве, крайне низкой концентрации его внутри клетки и, в общей сложности, истощении пула дофамина в организме.

Работы выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года) и приказу МЗ РФ от 19.06.2003 № 267. До начала экспериментов животных содержали в вентилируемом помещении при температуре 20°С, на стандартном пищевом рационе вивария биологического факультета БашГУ при свободном доступе к пище и воде.

Иммуногистохимический метод с использованием немеченых антител и иммуногистохимические реакции проводили по стандартной методике. После предварительной промывки в PBS и PBS с 0,1% Tween20 (PBST) проведена 30 минутная блокировка эндогенной пероксидазы 0,3% раствором перекиси водорода на 50% метаноле, растворенном на PBST. После нескольких промывок в PBST была проведена блокировка неспецифического связывания 1 ч при комнатной температуре в 4% блокирующем раствором, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин и 3% нормальную сыворотку козы, разведенные на PBST.

Затем при +4° С в течение 48 ч были проведены инкубации с первичными антителами: кроличьими к CART-пептиду (Phoenix Inc., США) - 1:5000. Все первичные антитела разводили на 1 % блокирующем растворе. После инкубации и тщательной промывки в PBST срезы инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч в соответствующих вторичных антителах, конъюгированных с биотипом против кролика (VectorLab., Великобритания) - 1:300. После промывки в PBS срезы на 1 ч также при комнатной температуре помещали в раствор стрептавидин-пероксидазы (Sigma, США), разведенной на PBS 1:500 [3]. После тщательной промывки в PBS свободноплавающие

срезы натягивали на стекла super frost (Menzel, Germany), предварительно покрытые 0,1% - 12-ым желатином и высушивали. Стекла из эксперимента с биотинилированным CART-пептидом подкрашивали гематоксилином Эрлиха. Далее стекла подвергали стандартной гистологической обработке и заключали в прозрачную среду Bio-Mount (Bio-Optica, Италия) [3]. Статистическая обработка полученной информации выполнялась и в программе Statistica v.10.0 (Stat Soft, США). Достоверными считались различия при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

В данной работе нами были исследованы некоторые структуры каудального уровня переднего отдела миндалевидного тела мозга: переднее кортикальное ядро (COa), медиальное ядро (Me), центральное ядро (Ce), и ядро ложа добавочного обонятельного тракта (BAOT).

Сравнительный анализ выявил достоверно повышенную концентрацию нейропептида в центральном ядре у крыс линии DAT-KO ($U=0,019$ при $p<0,05$), как важнейшего передатчика прямых проекций области, регулирующие витальные функции организма (Табл.).

Таблица. Оптическая плотность структур каудального уровня переднего отдела миндалевидного тела мозга

Структура МТ	M±m (%)		Значимые различия при p<0,05.
	Wistar	DAT-KO	
Ce	51,70±3,47	66,83±1,6	0,019*
Me	41,56±1,8	43,16±0,11	0,47
BAOT	47,05±0,91	50,13 ±0,38	0,45
COa	44,95±1,67	43,11±0,83	0,82

Центральное ядро МТ иногда рассматривается как «контролер ствола мозга» и использует свои широко распространенные проекции на гипоталамус и другие ядра ствола мозга, включая ретикулярную

формацию среднего мозга, координировать поведенческие, вегетативные и нейроэндокринные реакции.

Важность центрального ядра для избирательной обработки внимания дополнительно подчеркивается исследованием поведения животных. В эксперименте в каждой пробе крыс после сигнала готовности просовывали носом в один из трех портов, ориентируясь на кратковременное свечение одного из них. Крысы с поражением центрального ядра медленнее обучались заданию, чем контрольные животные. Дополнительные проблемы с вниманием, в том числе сокращение продолжительности освещения и изменение продолжительности сигнала готовности, оказали большее влияние на производительность крыс с повреждениями, чем у контрольных крыс. Интересно, что результаты были аналогичны результатам, наблюдаемым после повреждения базальной системы переднего мозга, что согласуется с идеей о том, что наблюдаемые эффекты поражения центрального ядра МТ опосредованы через эту систему.

Таким образом, факт о высоком уровне иннервации дофаминергическими нейронами в МТ мозга, а именно в центральном ядре, а также о свойстве дофаминергических нейронов экспрессировать CART - пептид (в том числе и в других областях организма) представляется значимым для дальнейшего исследования нормы и патологии дофаминергической системы на примере животных линии DAT-KO, как моделей нейродегенеративных заболеваний.

Поскольку центральное ядро является важным интегративным центром МТ, связь которого с другими образованиями лимбической системы осуществляется через его латеро-капсулярное субъядро, а также известно, что дорсомедиальное и заднее кортикальное ядра МТ имеют прямые связи с рецепторными и проводниковыми центрами обонятельного анализатора, то можно говорить об использовании интраназального - неинвазивного и быстрого введения лекарственных веществ. Было замечено, что некоторые вещества, введенные экзогенно на обонятельный эпителий, приводит к его аксональному транспорту в структуры МК. Интраназальный путь может быть использован для введения в мозг отдельных генов при помощи вирусных векторов-носителей. Данный подход позволяет осуществлять эффективную генную терапию, приводя к синтезу в отдельных областях мозга белков, недостаток которых вызвал патологию.

Список литературы

1. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Структурно-функциональная организация CART пептид экспрессирующих нейронов миндалевидного тела мозга // Оригинальные исследования. 2014. № 4. С. 11-14.
2. Романова И.В. Роль CART и AGRP в модуляции функциональной активности дофаминергических нейронов мозга: дис. … д-ра биол. наук: 03.03.01 – С. Петербург. 2012. –287 с.
3. Романова И.В. Морфофункциональное взаимодействие CART пептида и дофаминергических нейронов мозга // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2013. №1. С. 78-84.
4. Романова И.В., Михрина Е.В., Михайлова А.Л., Савельева Л.О. Участие CART-пептида в репаративных процессах в головном мозге взрослой крысы после фокальной ишемии // Гены & Клетки. 2017. №3. С. 208.
5. Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р. Амигдала в системе регуляции репродуктивных функций организма при абсансной эпилепсии. - Москва, 2018. – 148 с.
6. Хисматуллина З.Р. Миндалевидный комплекс мозга в системе регуляции репродуктивных функций организма: дис. …д-ра биол. наук: 06.02.01 - Уфа, 2009 – 293 с.
7. Rakovska A, Baranyi M, Windisch K, Petkova-Kirova P, Gagov H, Kalfin R. Neurochemical evidence that cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) 55-102 peptide modulates the dopaminergic reward system by decreasing the dopamine release in the mouse nucleus accumbens // Brain Res Bull. 2017. №134. P. 246-252.

©Хисматуллина З.Р., Садртдинова И.И., 2022

УДК 57.025
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.32

ПАРОДОКСАЛЬНОЕ СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ ТРЕВОЖНОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ У КРЫС: УНИКАЛЬНАЯ РОЛЬ НЕЙРОБИОЛОГИИ ГИППОКАМПА

© Цейликман В.Э.[1*], Цейликман О.Б.[2], Акулов А.Е.[3], Шевелев О.Б.[3], Хоцкина А.С.[3], Концевая Г.С.[3], Мошкин М.П.[3], Завьялов Е.Л.[3]

1.Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет) (ЮУрГУ), Челябинск, Россия
2. Челябинский государственный университет , Челябинск, Россия
3.Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
vadimed@yandex.ru

Аннотация. Парадоксальное снижение уровня тревожности при парадигме хронического стресса хищника (ПС) у крыс Sprague-Dawley недавно было показано в предыдущих работах. В данной работе мы изучили возможный нейробиологический механизм этого явления. Мы разделили крыс Sprague-Dawley, подвергшихся воздействию PS, на фенотипы с высокой и низкой тревожностью. Продолжительное влияние ФС на уровень кортикостерона, скорость кровотока в сонных артериях, коэффициент диффузии и спектры 1H ядерного магнитного резонанса в гиппокампе сравнивали у высокотревожных и низкотревожных крыс. Кроме того, мы оценили экспрессию гена BDNF в гиппокампе, который считается основным фактором нейропластичности. Мы показали, что у малотревожных крыс уровень кортикостерона был снижен, а скорость кровотока в сонных артериях увеличена. При этом в гиппокампе малотревожных крыс по сравнению с контрольной группой и высокотревожными крысами наблюдались следующие изменения: а) снижение уровня N-ацетиласпартата с одновременным повышением уровня фосфорилэтаноламина; (б) повышение уровня перекисного окисления липидов; в) уменьшение значения кажущегося коэффициента диффузии; (d) увеличение экспрессии гена BDNF. Основываясь на этих выводах, мы предположили, что вызванное стрессом снижение тревожности напрямую связано с повышением экспрессии гена BDNF. Низкий уровень кортикостерона и увеличение скорости кровотока в

сонных артериях могут способствовать экспрессии гена BDNF. Между тем, снижение значения кажущегося коэффициента диффузии и снижение уровня N-ацетиласпартата, а также повышение уровня перекисного окисления липидов в гиппокампе, возможно, отражали деструктивные изменения в гиппокампе. Мы предположили, что у крыс Sprague-Dawley эти морфологические изменения можно рассматривать как толчок к дальнейшему увеличению нейропластичности гиппокампа.

Ключевые слова: стресс хищника, тревога, гиппокамп, N-ацетиласпартат, фосфорилэтаноламин, BDNF, перекисное окисление липидов.

PARADOXICAL ANXIETY LEVEL REDUCTION IN ANIMAL CHRONIC STRESS: A UNIQUE ROLE OF HIPPOCAMPUS NEUROBIOLOGY

Tseilikman V[1], Tseilikman O[2], Akulov A[3], Shevelev O[3], Khotskina A[3], Kontsevaya G[3], Moshkin M[3], Zavjalov E[3].

1.South Ural State University (National Research University) (SUSU), Chelyabinsk, Russia

2. Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

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

vadimed@yandex.ru

Abstract. A paradoxical reduction in anxiety levels in chronic predator stress paradigm (PS) in Sprague–Dawley rats has recently been shown in previous works. In this paper, we studied the possible neurobiological mechanism of this phenomenon. We segregated PS-exposed Sprague–Dawley rats into the high- and low-anxiety phenotypes. The long-lasting effects of PS on corticosterone levels, blood flow speed in the carotid arteries, diffusion coefficient, and 1H nuclear magnetic resonance spectra in the hippocampus were compared in the high-anxiety and low-anxiety rats. In addition, we evaluated the gene BDNF expression in the hippocampus which is considered to be a main factor of neuroplasticity. We demonstrated that in low-anxiety rats, the corticosterone level was decreased and carotid blood flow speed was increased. Moreover, in the hippocampus of low-anxiety rats compared to the control group and high-anxiety rats, the following changes were observed: (a) a decrease in N-acetyl aspartate levels with a simultaneous increase in phosphoryl ethanol amine levels; (b) an increase in lipid peroxidation levels; (c) a decrease in apparent diffusion

coefficient value; (d) an increase in BDNF gene expression. Based on these findings, we proposed that stress-induced anxiety reduction is associated with the elevation of BDNF gene expression directly. Low corticosterone levels and a rise in carotid blood flow speed might facilitate BDNF gene expression. Meanwhile, the decrease in apparent diffusion coefficient value and decrease in N-acetyl aspartate levels, as well as an increase in the lipid peroxidation levels, in the hippocampus possibly reflected destructive changes in the hippocampus. We suggested that in Sprague–Dawley rats, these morphological alterations might be considered as an impetus for further increase in neuroplasticity in the hippocampus.

Keywords: predator stress, anxiety, hippocampus, N-acetyl aspartate, phosphoryl ethanol amine, BDNF, lipid peroxidation

Введение

Хронический стресс и высокие уровни глюкокортикоидов (ГК) вызывают функциональные и структурные изменения в головном мозге, особенно в гиппокампе, важной лимбической структуре, которая играет ключевую роль в когнитивных функциях, включая обучение и память [1,2,3,4,5]. Гиппокамп является основной областью пластичности мозга, поскольку в нем происходит замена нейронов, ремоделирование дендритов и обмен синапсов в ответ на многочисленные стрессовые события [12,13]. По словам Макьюэна, «гиппокамп стал воротами к пониманию того, как системные гормоны влияют на высшие функции мозга» [14]. Гиппокамп взаимодействует с различными областями мозга, включая префронтальную кору, миндалевидное тело и гипоталамус, для регулирования уровня тревожности в ответ на различные стрессовые состояния [15]. Хронический стресс ухудшает зависимую от гиппокампа пластичность с одновременным усилением тревожной реакции [16].

Недавно было показано, что на четырнадцатый день после многократного воздействия запахового стресса хищника тревожноподобное поведение наблюдалось только у крыс Wistar, но не у крыс Sprague-Dawley [17]. В свою очередь, среди стрессированных крыс Sprague-Dawley некоторые животные проявляли более низкий уровень тревожноподобного поведения по сравнению с другими стрессированными животными и контрольной группой. Примечательно, что среди крыс с анксиолитическим паттерном поведения примерно 80% реагировали на стрессор активно-наступательным образом [18]. С другой стороны, большинство крыс с пассивно-наступательными реакциями на стресс характеризовались высоким уровнем тревожности [18]. Более того, у активно атакующих

крыс был снижен уровень кортикостерона в плазме [18]. Гиппокамп представляет собой область мозга, реагирующую на глюкокортикоиды [19]. Ранее было показано, что длительное повышение концентрации глюкокортикоидов является причиной усадки дендритов и утраты шипов в гиппокампе, что может быть расценено как событие, нарушающее пластичность [20]. Высокие концентрации глюкокортикоидов подавляют ремоделирование нейронов гиппокампа и снижают их пластичность [14,21].

ГК оказывают многочисленные прямые и косвенные эффекты на гиппокамп [22]. Они делают это, воздействуя на глюкокортикоидные (ГР) и минералокортикоидные рецепторы (МР). GR широко распространены по всему мозгу [23]. Напротив, распространение MR в основном ограничивается гиппокампом [23]. Считается, что действие MR и GR как факторов транскрипции лежит в основе многих ответов на глюкокортикоиды [24,25]. Стресс вызывает увеличение кортикостерона, который активирует цитозольные глюкокортикоидные рецепторы [26,27,28]. Комплекс GR-GC транслоцируется в ядро, чтобы модулировать транскрипцию генов, с одной стороны, и в митохондрии, чтобы усилить митохондриальное окисление, с другой стороны [29]. Он также сопровождает дополнительную продукцию активных форм кислорода в митохондриальной электрон-транспортной цепи. Впоследствии увеличение продукции супероксида, перекиси водорода и гидроксильных радикалов приводит клетку к состоянию окислительного стресса, который вызывает окислительное повреждение ДНК, образование карбонила белка и перекисное окисление липидов мембраны (ПОЛ) [26].

Мы предположили, что повышение уровня ПОЛ в гиппокампе может отражать состояние целостности ткани. Кажущийся коэффициент диффузии, измеренный с помощью магнитно-резонансной томографии, можно считать жизненно важным маркером целостности нейронов [21]. В целом он вызывает апоптоз нейронов гиппокампа. Примечательно, что нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) ограничивал GC-индуцированный окислительный стресс в гиппокампе [22]. Некоторые метаболиты, обнаруженные с помощью спектров ядерного магнитного резонанса 1H, такие как N-ацетиласпартат (NAA) и фосфорилэтаноламин (PEA), также считаются маркерами жизнеспособности нейронов [22]. Вполне возможно, что косвенное вредное воздействие ГК на гиппокамп может быть связано с изменением скорости мозгового кровотока. Недавно сообщалось, что введение ГК снижает мозговой кровоток в гиппокампе и таламусе у собак [24].

В свете этих соображений в этом исследовании мы изучили, связаны ли крысы PS с низким и высоким уровнем тревожности с различными концентрациями кортикостерона, скоростью мозгового кровотока, изменениями уровней NAA и PEA, уровнями свободнорадикального окисления и концентрациями BDNF в организме. гиппокамп.

Методы

Крыс подвергали воздействию запаха кошачьей мочи в чашке Петри с подстилкой в течение 10 минут ежедневно в течение 10 дней (21 крыса подвергалась стрессовому воздействию; 8 контрольных крыс подвергались воздействию нейтрального запаха). Повторное воздействие PSS может быть более точной моделью посттравматического стрессового расстройства человека, чем однократное острое воздействие, при условии, что оно сводит к минимуму влияние смешанных факторов, таких как концентрация феромонов при каждом отдельном воздействии запаха мочи [22]. Все процедуры проводились с 13:00 до 14:00. Во время протокола воздействия запаха поведение, связанное со стрессом, ежедневно фиксировалось с помощью веб-камеры. Поведенческую оценку проводили с помощью системы трехмерного слежения за животными «EthoStudio» [18]. Оценщик поведения ранее не работал ни с одной крысой в наших группах. Регистрируемые переменные включали время, проведенное в открытом и закрытом ответвлениях лабиринта, и количество входов в открытые и закрытые ответвления.

График моделирования ПСС, оценки связанного со стрессом поведения и тревоги и измерения метаболитов (CORT, Glu + Gln и 11-дегидрокортикостерон) в плазме, головном мозге и надпочечниках соответственно был следующим :

Дни 1–10: ПСС;

11–22 дни: отдых;

День 23: тест в приподнятом крестообразном лабиринте;

24-й день измерения скорости кровотока в сонной артерии методом MPA;

День 25 измерение кажущегося коэффициента диффузии гиппокампа с помощью MPT;

День 27: измерение метаболитов гиппокампа с помощью MRS;

День 28: эвтаназия, забор крови и органов.

Уровень тревожности крыс, подвергшихся стрессу хищника, был проверен с помощью приподнятого крестообразного лабиринта (EPM), как было опубликовано ранее [54,55]. На следующий день

после 14-дневного постстрессорного периода крыс подвергали ЭПМ-тесту. Регистрировались следующие параметры: 1) количество заходов в открытые рукава; (2) количество входов в закрытые рукава; (3) время, проведенное в распростертых объятиях; (4) время нахождения в закрытых рукавах.

На основании этих измерений был рассчитан индекс тревожности (ИТ): ИЕ = 1 – {[(время пребывания в открытых рукавах/время нахождения в лабиринте) + (количество входов в открытые рукава/количество всех входов)]/2}

Результаты

Для всех крыс, подвергшихся хроническому ПС, не выявлено достоверных изменений времени нахождения в открытых ответвлениях приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ), времени нахождения в закрытых ответвлениях (X = 0,5, p = 0,74). по обоим параметрам), по количеству входов в открытые (X = 0,9, p = 0,52) и закрытые рукава (X = 1,5, p = 0,38), по величине индекса тревожности (ИТ) (X = 1,34). , p = 0,42). Однако существенные различия были обнаружены при разделении крыс PS на поведенческие фенотипы. Низкотревожные крысы проводили больше времени в открытых ответвлениях ПКП (p = 0,025) и меньше времени в закрытых рукавах (p = 0,025). ИТ у крыс с низкой тревожностью был значительно меньше, чем у контрольных крыс, тогда как ИТ у крыс с высокой тревожностью существенно не отличался от такового у контрольных крыс.

Установлены значительные различия в концентрации кортикостерона в плазме (CORT) у крыс, подвергшихся воздействию PSS (X = 16,58; p = 0,0003;). Уровни CORT у низкотревожных крыс были снижены по сравнению с контролем и высокотревожными крысами (p = 0,0027 и p = 0,0006 соответственно). Не было обнаружено существенных различий в уровнях CORT в плазме между контрольными и высокотревожными крысами. Мы также не обнаружили различий в концентрации КОРТ в плазме у крыс, подвергшихся воздействию ПСС, по сравнению с контрольной группой (W = 91, p = 0,096 тест Манна-Уитни)..

Выявлены достоверные различия объемного кровотока обеих сонных артерий во всех экспериментальных группах (X = 9,84; p = 0,01). У малотревожных крыс значительно увеличился кровоток по сравнению с высокотревожными и контрольными животными (p = 0,008 и 0,016 соответственно). Статистически значимых различий в кровотоке у высокотревожных крыс по сравнению с контрольной группой не было (p = 0,37). Более того, критерий Манна-Уитни не

выявил достоверных различий объемного кровотока в обеих сонных артериях в группе, подвергшейся ПСС, по сравнению с контролем (W = 39; p = 0,16).

Статистический анализ выявил достоверные различия значений АДК в гиппокампе между всеми экспериментальными группами крыс (X = 8,76; p = 0,01). Значения ADC в гиппокампе малотревожных крыс были значительно снижены по сравнению с контрольными животными (p = 0,016;). Крысы с высокой тревожностью демонстрировали повышенные параметры ADC по сравнению с крысами с низкой тревожностью (p = 0,017). Достоверных различий между высокотревожными и контрольными животными не обнаружено (p = 0,44). Несмотря на наличие достоверных различий между высоко- и низкотревожным фенотипами, мы не обнаружили различий в значениях АДК в гиппокампе суммарной выборки крыс, подвергшихся ПСС, по сравнению с контрольной группой животных (W = 39; p = 0,16). Более того, выявлена достоверная корреляция между значениями АКД в гиппокампе и кровотоком в обеих сонных артериях у крыс, подвергшихся воздействию ФС (r = -0,5, p = 0,035;, а также между значениями АКД и уровнем кортикостерона у крыс, подвергшихся стрессу r = -0,67, p = 0,0003. Однако мы не обнаружили корреляции между значениями АДК в гиппокампе и кровотоком в обеих сонных артериях у высокотревожных крыс.

Установлены значительные различия в уровне N-ацетиласпартата (НАА) в гиппокампе всех экспериментальных групп (X = 6,53; p = 0,038,). Снижение уровня NAA в гиппокампе выявлено у высокотревожных крыс по сравнению с контрольными животными (p = 0,04). Также были обнаружены значительные различия в уровне NAA в гиппокампе у малотревожных крыс по сравнению с контрольными животными (p = 0,05). Мы не обнаружили различий в уровне NAA в гиппокампе между высоко- и низкотревожными крысами (p = 0,41). Корреляционный анализ не выявил значимой взаимосвязи между переменными во всех протестированных группах. PSS не изменил уровни NAA в гиппокампе по сравнению с контрольными животными.

Установлена значительная разница между экспериментальными группами в уровне растворимых в пропаноле2 кетодиенов и конъюгированных триенов (X = 11,42; p = 0,003). В группе ПС содержание кетодиенов и конъюгированных триенов была выше (W = 25,5, p = 0,025), чем у не подвергавшихся стрессу контрольных крыс. У низкотревожных крыс концентрация кетодиенов и конъюгированных триенов в гиппокампе также была выше, чем у контрольных крыс (p = 0,006), и выше по сравнению с

высокотревожными крысами (p = 0,019). У высокотревожных крыс концентрация кетодиенов и конъюгированных триенов достоверно не отличалась от таковой у контрольных крыс (p = 0,61).

Наблюдалась положительная корреляция между кетодиенами и конъюгированными триенами и скоростью кровотока в обеих сонных артериях (r = 0,67; p = 0,0003;). Также была обнаружена отрицательная корреляция между уровнями кетодиенов и конъюгированных триенов и значениями ADC гиппокампа (r = -0,65; p = 0,0004;).

Экспериментальные группы значительно различались по уровням экспрессии мРНК BDNF в гиппокампе (X = 9,2; p = 0,01;). Крысы с низким уровнем тревожности демонстрировали более высокие уровни мРНК BDNF, чем контрольные животные (p = 0,008). Достоверных различий в уровнях мРНК BDNF между высокотревожными крысами и контрольными животными не было (p = 0,22). Нам удалось обнаружить значительную разницу в уровнях экспрессии мРНК BDNF между группой PSS и контрольными животными (W = 19, p = 0,008).

Обсуждение

В настоящем исследовании изучались крысы Sprague-Dawley с разным уровнем тревожности (фенотипы низкой и высокой тревожности). Ferguson и Cada ранее сообщали, что тревожноподобное поведение в EPM является наиболее заметным у крыс линии Sprague-Dawley по сравнению с линией крыс Wistar-Kyoto [30]. Наши предыдущие данные на крысах Wistar [17] вместе с результатами настоящего исследования подтвердили, что крысы Sprague-Dawley характеризуются выраженным тревожноподобным поведением.

PS по-разному модифицировал ИИ крыс Sprague-Dawley и Wistar в EPM. Воздействие ФС усиливало тревожноподобное поведение у крыс линии Вистар [22]. ИИ крыс Sprague-Dawley сильно зависел от копинг-стратегии в ответ на воздействие ФС [36]. У крыс с активной наступательной реакцией (AOP) на хронический ФС зарегистрированы снижение тревожноподобного поведения и более низкие уровни ХС в плазме по сравнению с крысами с пассивно-оборонительно-наступательной реакцией (ПДР). Интересно, что недавнее исследование показало, что стрессированные крысы были разделены на два поведенческих фенотипа на основе немедленной реакции животных на стрессор [18,20]. В настоящей работе в качестве специфического индикатора поведенческих фенотипов экспериментальных групп крыс приняты долговременные последствия ПС. Мы обнаружили, что у AOR- и низкотревожных крыс

наблюдалось снижение тревожноподобного поведения и низкий уровень CS после воздействия ФС [18]. Однако процент AOP-крыс был значительно ниже, активные крысы были в меньшинстве, а малотревожные крысы составляли большинство среди общего числа стрессированных животных. Принимая это во внимание, можно предположить, что у части крыс ПДР после ПС наблюдалось низкое тревожноподобное поведение, а у другой части - нет. Более того, не было обнаружено сходства между крысами AOP и малотревожными крысами в характере спектров 1ГМР в гиппокампе и стриатуме [24]. Однако основное сходство между крысами AOR и крысами с низким уровнем тревожности заключалось в том, что у них обоих был низкий уровень CS. Это хорошо согласуется с результатами более ранних исследований [20, 21, 22, 24, 27]. Недавнее исследование показало, что хроническое воздействие ФС сопровождалось снижением уровня ХС в плазме у крыс Вистар, причем уровни ХС снижались у крыс с низкой тревожностью более значительно, чем у крыс с высокой тревожностью [17]. Это также согласуется с результатами других исследований на крысах Sprague-Dawley.

Отсутствие статистически значимых результатов в группе повышенной тревожности можно объяснить тем, что все измерения проводились через 12–14 дней после прекращения воздействия ФС. Вполне возможно, что значимые изменения у высокотревожных крыс исчезли раньше. Консервативность высокотревожных крыс может быть связана с особенностями их метаболического состояния. В наших предыдущих исследованиях, проведенных на крысах Wistar [27], мы также наблюдали более низкую вариабельность нейроэндокринных изменений у стрессированных крыс с высокой тревожностью по сравнению с группой с низкой тревожностью. В то же время была обнаружена интересная корреляция между уровнем тревожности и уровнем микросомального окисления, определяемым in vivo с помощью гексеналового теста сна [21]. Кроме того, животные с длительной продолжительностью гексенального сна считались медленными метаболизаторами. Оказалось, что среди высокотревожных крыс большинство были медленными метаболизаторами. Между тем, медленные метаболизаторы обычно рассматриваются как метаболически консервативный фенотип [24].

Повышение уровня кровотока в сонных артериях у крыс с низким уровнем тревожности является принципиальным и важным результатом текущего исследования. Отрицательная корреляция между значениями ИИ и каротидным кровотоком может свидетельствовать о наличии связи между моделями поведения и мозговым кровотоком у

крыс PS. При этом особое значение имеет крайняя зависимость головного мозга от доставки кислорода, глюкозы и других субстратов из крови [22]. Кроме того, полученные данные также указывают на возможную связь между низким уровнем ГК и усилением мозгового кровотока. Этот случай подтверждается отрицательной корреляцией между скоростью кровотока в обеих сонных артериях и концентрацией ХС в плазме. Это согласуется с отчетами, демонстрирующими, что введение ГК может снизить CBF [29].

Анализ МРТ выявил снижение значения АКД в гиппокампе. Здесь для массива ADC мы выполнили процедуру диффузионно-весовых изображений (DWI), которая основана на расчете интенсивности диффузии H2O через ткани [23]. Низкая интенсивность диффузии H2O свидетельствует о нарушении целостности ткани [20]. Поэтому мы предполагаем, что более низкие уровни ADC могут отражать нарушение целостности гиппокампа у крыс с низким уровнем тревожности.

Общепринято, что N-ацетиласпартат (NAA) считается маркером жизнеспособности нейронов [24]. NAA неоднократно вовлекался во многие процессы, протекающие в центральной нервной системе (ЦНС). Например, он может участвовать в регуляции синтеза нейронального белка, выработки миелина или метаболизма нескольких нейротрансмиттеров, таких как аспартат или N-ацетил-аспартил-глутамат [21]. Сокращение NAA было синхронизировано со снижением CS у крыс с низким уровнем тревожности.

Литература

1. Saeedi M., Rashidy-Pour A. Association between chronic stress and Alzheimer’s disease: Therapeutic effects of Saffron. *Biomed. Pharmacother.* 2020;133:110995. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110995.

2. Lupien S.J., Juster R.-P., Raymond C., Marin M.-F. The effects of chronic stress on the human brain: From neurotoxicity, to vulnerability, to opportunity. *Front. Neuroendocrinol.* 2018;49:91–105. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.02.001.

3. Gray J.D., Kogan J.F., Marrocco J., McEwen B.S. Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2017;13:661–673. doi: 10.1038/nrendo.2017.97.

4. Conrad C.D., Ortiz J.B., Judd J.M. Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: Methodological and functional considerations. *Physiol. Behav.* 2017;178:66–81. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.11.017.

5. Herman J.P., McKlveen J.M., Ghosal S., Kopp B., Wulsin A., Makinson R., Scheimann J., Myers B. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr. Physiol.* 2016;6:603–621. doi: 10.1002/cphy.c150015.
6. Lucassen P.J., Oomen C.A., Naninck E.F., Fitzsimons C.P., Van Dam A.-M., Czeh B., Korosi A. Regulation of Adult Neurogenesis and Plasticity by (Early) Stress, Glucocorticoids, and Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7:a021303. doi: 10.1101/cshperspect.a021303.
7. Laham B.J., Gould E. How Stress Influences the Dynamic Plasticity of the Brain's Extracellular Matrix. *Front. Cell. Neurosci.* 2022;15:814287. doi: 10.3389/fncel.2021.814287.
8. Surget A., Belzung C. Adult hippocampal neurogenesis shapes adaptation and improves stress response: A mechanistic and integrative perspective. *Mol. Psychiatry.* 2021;27:403–421. doi: 10.1038/s41380-021-01136-8.
9. Vlachos I.I., Papageorgiou C., Margariti M. Neurobiological Trajectories Involving Social Isolation in PTSD: A Systematic Review. *Brain Sci.* 2020;10:173. doi: 10.3390/brainsci10030173.
10. Cabib S., Campus P., Conversi D., Orsini C., Puglisi-Allegra S. Functional and Dysfunctional Neuroplasticity in Learning to Cope with Stress. *Brain Sci.* 2020;10:127. doi: 10.3390/brainsci10020127.
11. Montes-Rodriguez C.J., Urteaga-Urias E. Plasticidad sinaptica como sustrato de la resiliencia Synaptic plasticity as a substrate of resilience. *Rev. Neurol.* 2018;67:453–460
12. McEwen B.S., Eiland L., Hunter R.G., Miller M.M. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology.* 2012;62:3–12. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.014.
13. McEwen B.S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. *Chronic Stress.* 2017;1:2470547017692328. doi: 10.1177/2470547017692328.
14. McEwen B.S., Nasca C., Gray J.D. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41:3–23. doi: 10.1038/npp.2015.171.
15. Ghasemi M., Navidhamidi M., Rezaei F., Azizikia A., Mehranfard N. Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 2021;22:431–449. doi: 10.3758/s13415-021-00973-y.
16. Tomar A., McHugh T.J. The impact of stress on the hippocampal spatial code. *Trends Neurosci.* 2021;45:120–132. doi: 10.1016/j.tins.2021.11.005.

17. Shevelev O.B., Tseilikman V.E., Khotskin N.V., Khotskina A., Kontsevaya G.V., Lapshin M.S., Moshkin M.P., Komelkova M., Feklicheva I.V., Tseilikman O.B., et al. Erratum to: Anxiety and neurometabolite levels in the hippocampus and amygdala after prolonged exposure to predator-scent stress. *Vavilov J. Genet. Breed.* 2020;24:108. doi: 10.18699/VJ20.601.
18. Ullmann E., Chrousos G., Perry S.W., Wong M.-L., Licinio J., Bornstein S.R., Tseilikman O., Komelkova M., Lapshin M.S., Vasilyeva M., et al. Offensive Behavior, Striatal Glutamate Metabolites, and Limbic-Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress in Chronic Anxiety. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:7440. doi: 10.3390/ijms21207440.
19. McEwen B.S. Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 2016;1645:50–54. doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.043.
20. Nasca C., Zelli D., Bigio B., Piccinin S., Scaccianoce S., Nisticò R., McEwen B.S. Stress dynamically regulates behavior and glutamatergic gene expression in hippocampus by opening a window of epigenetic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112:14960–14965. doi: 10.1073/pnas.1516016112.
21. Podgorny O.V., Gulyaeva N.V. Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: Contribution of subgranular neurogenesis. *J. Neurochem.* 2020;157:370–392. doi: 10.1111/jnc.15265.
22. Brocca M.E., Pietranera L., de Kloet E.R., De Nicola A.F. Mineralocorticoid Receptors, Neuroinflammation and Hypertensive Encephalopathy. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2018;39:483–492. doi: 10.1007/s10571-018-0610-9.
23. Uchoa E.T., Aguilera G., Herman J.P., Fiedler J.L., Deak T., de Sousa M.B.C. Novel aspects of glucocorticoid actions. *J. Neuroendocr.* 2014;26:557–572. doi: 10.1111/jne.12157.
24. Chaouloff F., Groc L. Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress. *Front. Neuroendocr.* 2011;32:25–42. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.07.004.
25. Rogalska J. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in hippocampus: Their impact on neurons survival and behavioral impairment after neonatal brain injury. *Vitam. Horm.* 2010;82:391–419. doi: 10.1016/S0083-6729(10)82020-5.
26. Joëls M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;583:312–321. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.064.
27. De Kloet E.R., Karst H., Joëls M. Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow. *Front. Neuroendocr.* 2008;29:268–272. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.10.002.

28. Sato H., Takahashi T., Sumitani K., Takatsu H., Urano S. Glucocorticoid Generates ROS to Induce Oxidative Injury in the Hippocampus, Leading to Impairment of Cognitive Function of Rats. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 2010;47:224–232. doi: 10.3164/jcbn.10-58.
29. You J.-M., Yun S.-J., Nam K.N., Kang C., Won R., Lee E.H. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2009;87:440–447. doi: 10.1139/Y09-027.

©В.Э.Цейликман, О.Б.Цейликман, А.Е. Акулов,
О.Б. Шевелев, А.С. Хоцкина, Г.С.Концевая, М.П. Мошкин,
Е.Л.Завьялов, 2022

УДК: 611.348
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.33

ИЗУЧЕНИЕ ИННЕРВАЦИИ СТЕНКИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ КРЫСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕЙРАЛЬНЫХ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

© Чумасов Е.И.[1,2*], Петрова Е.С.[1]
[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия
*iemmorphol@yandex.ru

Аннотация. Цель работы - изучение нервных аппаратов стенки толстой кишки лабораторной крысы с помощью нейроиммуногистохимических маркеров (белка ПГП 9.5 и тирозингидроксилазы (ТН)). Иммуногистохимические реакции проводились на парафиновых срезах стенки ободочной кишки крысы (n=6). Для выявления нервных сплетений, нейронов, нервных пучков и терминалей использовали поликлональные кроличьи антитела к нейральному маркеру белку ПГП 9.5 и поликлональные кроличьи антитела к ферментному маркеру, позволяющему идентифицировать симпатические нервные структуры, тирозингидроксилазе. Отмечена высокая плотность распределения нервных структур в слизистой оболочке ободочной кишки крысы. Сравнительный иммуногистохимический анализ позволил заключить, что ПГП 9.5-иммунореактивные холинергические нервные аппараты присутствуют во всех тканях стенки кишки и, следовательно, участвуют в иннервации всех ее оболочек. ТН-иммунопозитивные структуры обнаружены вокруг нейронов Ауэрбахова и Мейснерова сплетений, в *мышечной пластинке слизистой оболочки и вокруг кровеносных сосудов подслизистой основы.* В *изученном отделе толстого кишечника симпатические нейроны не обнаружены.*

Ключевые слова: ободочная кишка крысы, иммуногистохимия, белок ПГП 9.5, тирозингидроксилаза

STUDY OF RAT COLON INNERVATION USING NEURAL IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS

Chumasov E.I.[1,2]*, Petrova E.S.[1]
[1]Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, Russia;
[2]St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia
*iemmorphol@yandex.ru

Abstract. The aim of this work is to study the nervous apparatuses of the large intestine wall of a laboratory rat using neuroimmunohistochemical markers (PGP 9.5 protein and tyrosine hydroxylase (TH)). Immunohistochemical reactions were carried out on paraffin sections of the rat colon wall (n=6). To identify nerve plexuses, neurons, nerve bundles, and terminals, polyclonal rabbit antibodies to the neural marker protein PGP 9.5 and polyclonal rabbit antibodies to tyrosine hydroxylase were used. Tyrosine hydroxylase is an enzymatic marker that allows identification of the structures of the sympatic nervous system. A high density of distribution of nerve structures in the mucous membrane of the rat colon was noted. Comparative immunohistochemical analysis made it possible to conclude that PGP 9.5-immunoreactive cholinergic nerve apparatuses are present in all tissues of the intestinal wall and, therefore, participate in the innervation of all its membranes. TH-immunopositive structures were found around the neurons of the Auerbach and Meissner plexuses, in the muscularis mucosa, and around the blood vessels of the submucosa. No sympatic neurons were found in the studied section of the large intestine.

Keywords: rat colon, immunohistochemistry, PGP 9.5 protein, tyrosine hydroxylase

Введение

Энтеральная нервная система (ЭНС), являющаяся частью метасимпатической нервной системы [1, 2], играет основную роль в создании координированных движений кишечника. Структурные элементы ЭНС представлены диффузными ганглиозными нервными сплетениями. В конце прошлого столетия иннервация органов ЖКТ изучалась с применением электрофизиологических, фармакологических, гистохимических, биохимических методов исследования. Структурные элементы ЭНС исследовали с применением классических гистологических методов и электронной микроскопии [2-5]. Применение иммуногистохимических методов

выявления селективных медиаторных белков весьма актуально для изучения морфологии и иннервации кишечной стенки в наши дни [6, 7]. Они необходимы для выяснения нерешённых до конца вопросов о функциональных межнейронных взаимоотношениях и о нейромедиаторном статусе нервных элементов различных отделов ЖКТ позвоночных животных и человека. Целью настоящей работы явилось изучение морфологических особенностей нервных структур в стенки толстого кишечника крысы с помощью нейроиммуногистохимических маркеров (белка ПГП 9.5 и тирозингидроксилазы).

Материалы и методы

Работа проведена на крысах Вистар массой 200-250 г (n = 6). Крыс выводили из эксперимента передозировкой паров этилового эфира, выделяли фрагменты ободочной кишки размером 1,5 см и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [8]. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации материал заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Иммуногистохимические (ИГХ) реакции на белок ПГП 9.5 и тирозингидроксилазу проводили на парафиновых срезах. Белок ПГП 9.5 применяли для выявления нервных стволов и пучков, нервных сплетений и клеток без учета их медиаторной специфики [9]. Для его выявления использовали поликлональные кроличьи антитела (Spring Bioscience, США). Для идентификации катехоламинергических структур симпатической нервной системы применяли поликлональные кроличьи антитела к тирозингидроксилазе (Abcam, Великобритания). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection System (Bio Genex, США). Часть срезов подкрашивали толуидиновым синим. Для иммуногистохимических реакций проводили отрицательный контроль с нанесением на срезы вместо первичных антител их разбавителя (Dako, Дания). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

Результаты и обсуждение

С помощью ИГХ-реакции на белок ПГП 9.5 на поперечных срезах через ободочную кишку крысы хорошо выявляются межмышечное (ММНС) и подслизистое (ПСНС) нервные сплетения. ПСНС располагается в рыхлой соединительной ткани и состоит из немиелинизированных нервных пучков и микроганглиев (рис. 1; 3,а). В

нем также присутствует большое количество кровеносных сосудов. Часть тонких пучков безмиелиновых аксонов, отходящих от нервных клеток микроганглиев ПСНС, проникает через мышечную пластинку на границе подслизистой и слизистой оболочек и входят в область крипт ободочной кишки (рис. 1; 2, а). Здесь они разветвляются и формируют терминальные сплетения (рис. 2, б).

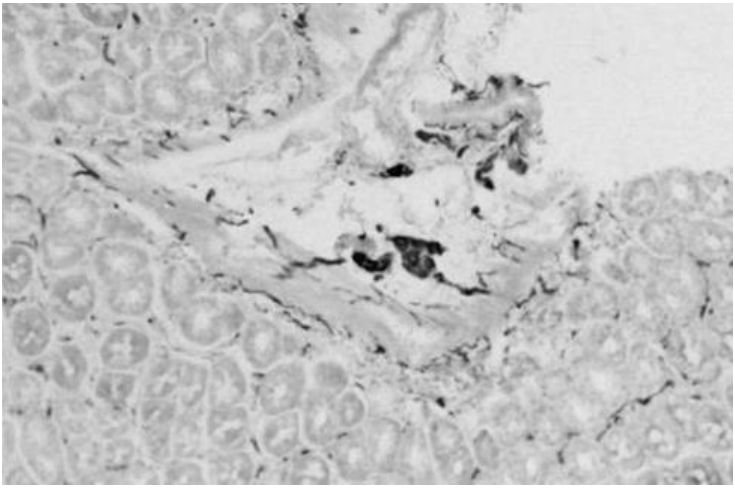


Рис. 1. Общий вид подслизистого и слизистого нервных сплетений на поперечном срезе ободочной кишки крысы. Иммуногистохимическая реакция на белок ПГП 9.5. Ув.: х100.

Показано, что слизистая оболочка, содержащая разные клеточные элементы (клетки эпителия, гладкомышечные клетки, эндотелий сосудов, соединительнотканные элементы, тучные клетки и др.), богато иннервирована парасимпатическими ПГП 9.5^{+} холинергическими нервными волокнами. Эти волокна предположительно представляют собой как эфферентные, так и афферентные терминальные аксоны. Установлено, что в области крипт многие из таких аксонов находятся в тесной связи с эндотелием капилляров и лимфатическими сосудами.

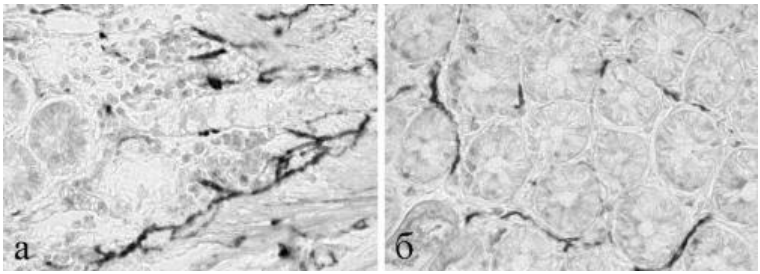


Рис. 2. Фрагменты терминальных варикозных аксонов в рыхлой соединительной ткани на границе мышечной пластинки слизистой оболочки и области крипт (а) и в собственно слизистой оболочке (б). Иммуногистохимическая реакция на белок ПГП 9.5. Подкраска толуидиновым синим. Ув.: х400

Сравнительный иммуногистохимический анализ показал, что во всех слоях слизистой оболочки толстой кишки крысы преобладают ПГП 9.5^{+} парасимпатические нервные волокна. Особенно многочисленные нервные сплетения найдены в продольном и циркулярном слоях мышечной оболочки (рис. 3,б). При этом симпатические волокна, содержащие тирозингидроксилазу, в мышечных слоях практически не выявляются, за исключением единичных сплетений вокруг мелких артерий. Это свидетельствует о преобладающей роли в иннервации мышечных тканей стенки толстой кишки именно парасимпатических нервных структур.

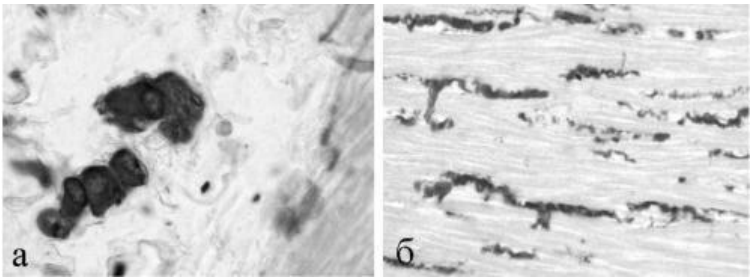


Рис. 3. Холинергические нервные клетки в микроганглии подслизистого сплетении (а) и нейромышечные синапсы в циркулярном мышечном слое стенки ободочной кишки крысы (б). Иммуногистохимическая реакция на белок ПГП 9.5. Подкраска толуидиновым синим. Ув.: х400.

ТН-иммунопозитивные симпатические аппараты были обнаружены в виде синаптических терминалей главным образом

вокруг холинергических нейронов Ауэрбахова и Мейснерова сплетений, и отчасти в мышечной пластинке слизистой оболочки и вокруг мелких артериальных сосудов подслизистой основы. Симпатические нейроны в изученном отделе толстого кишечника не выявлены. Сравнительный иммуногистохимический анализ позволил установить, что большинство нервных структур стенки кишки являются холинергическими. ПГП 9.5-иммунореактивные холинергические нервные аппараты присутствуют в тканях всех трех оболочек стенки кишки и ответственны за многие функции (пищеварения, эвакуации и обмена органических веществ, секреторную, за различные типы перистальтики), в то время, как симпатические - в основном осуществляют регуляцию холинергических рефлексов через нейроны Ауэрбахова и Мейснерова сплетений, стимулируя или ингибируя их активность, а также отвечают за нейротрофику.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания ФГБНУ «ИЭМ».

Исследование было рассмотрено и одобрено этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (протокол № № 3/19 от 21.04.2019).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Ноздрачев А.Д. Физиология вегетативной нервной системы. Л., Медицина. 1983.
2. Ноздрачев А. Д., Чумасов Е. И. Периферическая нервная система. СПб.: Наука, 1999.
3. Лаврентьев Б.И. Теория строения вегетативной нервной системы. М., Медицина. 1983.
4. Колосов Н.Г., Хабарова А.Я. Структурная организация вегетативных ганглиев. Л., Наука. 1978.
5. Furness J. B. Types of neurons in the enteric nervous system // J. Auton. Nerv. Syst. 2000. Vol. 81. № 1-3. P. 87–96.
6. Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Исследование иннервации двенадцатиперстной кишки крысы с использованием нейральных иммуногистохимических маркеров // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. Т. 106. № 7. С. 853–865.

7. Masliukov P.M., Emanuilov A.I.,.Budnik A.F. Sympathetic innervation of the development, maturity, and aging of the gastrointestinal tract // Anat Rec (Hoboken). 2022. 28. doi: 10.1002/ar.25015.
8. Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (Review) // Modern Technologies in Medicine. 2018. Vol.10. №2. С. 156-165.
9. Коржевский Д. Э., Колос Е. А. Белок PGP 9.5 и его использование в качестве функционального маркера в нейроморфологии // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13. №4. С.29-35.

© Чумасов Е.И., Петрова Е.С., 2022

УДК 612.821
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.34

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРЫС ЛИНИИ WISTAR ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»

© Шамсутдинова Динара А.*, Шамсутдинова Дилара А., Садртдинова И.И.
Башкирский государственный университет, г. Уфа
* dinara.shamsutdinova.99@inbox.ru

В настоящем исследовании был проведён анализ влияния низких температур на поведенческие реакции самцов крыс линии Wistar в тесте «открытое поле». В ходе эксперимента мы наблюдали уменьшение числа пересечённых квадратов у опытных животных по сравнению с контрольными: в центре с 10,00±2,14 до 4,00±0,88 и на периферии с 39,46±3,23 до 19,45±3,50 ($p<0,05$). Количество вертикальных стоек в центре снизилось на 83,74%, а на периферии – на 62,78%. При оценке эмоционального статуса крыс было выявлено, что после воздействия холодового фактора количество актов дефекации достоверно увеличилось с 1,55±0,16 до 4,83±0,10. Таким образом, снижение двигательной активности, исследовательской деятельности и возрастание показателей эмоционального статуса опытных животных говорило о повышении уровня тревожности крыс.

Ключевые слова: стресс; низкие температуры; тест «открытое поле»; тревожность; крысы линии Wistar.

BEHAVIORAL PARAMETERS OF WISTAR RATS UNDER THE INFLUENCE OF LOW TEMPERATURES

Shamsutdinova Dinara A.*, Shamsutdinova Dilara A., Sadrtdinova I.I.
Bashkir State University, Ufa, Russia
* dinara.shamsutdinova.99@inbox.ru

In this study, the influence of low temperatures on the behavioral reactions of male Wistar rats in the "open field" test was analyzed. During the experiment, we observed a decrease in the number of crossed squares in experimental animals compared to control ones: in the center from 10.00±2.14 to 4.00±0.88 and in the periphery from 39.46±3.23 to

19.45±3.50 ($p<0.05$). The number of vertical racks in the center decreased by 83.74%, and on the periphery – by 62.78%. When assessing the emotional status of rats, it was revealed that after exposure to the cold factor, the number of acts of defecation significantly increased from 1.55 ± 0.16 to 4.83 ± 0.10. Thus, a decrease in motor activity, research activity and an increase in the indicators of the emotional status of experimental animals indicated an increase in the level of anxiety of rats.

Keywords: stress; low temperatures; "open field" test; anxiety; Wistar rats.

Введение

Стрессом называют совокупность изменений, появляющихся в организме под давлением различных повреждающих агентов, а также активацию приспособительных механизмов, способствующих привыканию к меняющимся условиям среды [6]. Стрессовый фактор способен оказывать влияние не только на морфологическую структуру, но и на физиологические и поведенческие характеристики, как животных, так и людей. Многие исследования также подтверждают возможность изменения в когнитивных процессах и памяти при стрессовых ситуациях.

В последнее время важной причиной возникновения стресса считают низкие температуры окружающей среды [6]. Такие климатические условия служат одним из опасных производственных факторов, обуславливающих появление холодового стресса. Воздействие холода выражается, при этом, не только переохлаждением внутренних и поверхностных тканей организма человека, но и функциональными изменениями, такими, как снижение работоспособности, иммунитета, нарушением поведенческих функций, появлением расстройств в процессах памяти [4].

На данный момент научный интерес представляет изучение связи между стрессом и уровнем тревожности. Тревожностью называют состояние беспокойства по поводу неопределённого негативного события [2]. Такое состояние настраивает организм к тому, чтобы противостоять определённой угрозе извне. Опасность долгой продолжительности тревожного состояния заключается в возможности возникновения других серьёзных расстройств психики, таких как панические атаки и депрессия. Как утверждают учёные во многих исследованиях, причиной тревожного поведения служат нарушения в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и норадренергической системах [8].

О возникновении стрессовой ситуации можно определить по наличию изменений в поведенческих реакциях экспериментальных животных. Для оценки воздействия стресса на особенности поведения применяются различные тесты, в том числе и тест «открытое поле» [3]. Он позволяет характеризовать выраженность отдельных компонентов поведенческих реакций, уровень эмоциональности и двигательной активности испытуемых. Также, с помощью данного теста мы можем изучить нейроэндокринные взаимодействия и функции нервной системы.

О выраженности реакций на стресс у крыс судят по показателям исследовательской и двигательной активности. При развитии тревожного состояния в ответ на влияние стресса не исключается возможность снижения этих параметров. Доказательство таких предположений нуждается в проведении экспериментов на лабораторных животных в условиях стресса.

Целью работы стало изучение поведенческих показателей крыс в норме и при холодовом воздействии в тесте «открытое поле».

Материалы и методы

Исследования проводились на 12 крысах-самцах линии Wistar с массой тела 250-280 г. Из них 6 животных составили контрольную группу, 6 - опытную группу. Используемые в опыте крысы содержались в условиях вивария кафедры физиологии и общей биологии Башкирского государственного университета, отличающейся постоянством уровня влажности и комнатной температуры (20–22 ^{o}C). Принципы Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным (2000 г.) при работе с самцами крыс полностью соблюдались.

Моделирование адаптации к низким температурам окружающей среды проводилось путём наложения на тело в область мошонки наполненной льдом груши на протяжении 5 дней по схеме Х. Э. Марзуки, предложенной в 2021 году [6].

Изучение поведенческих особенностей опытных животных в условиях стресса осуществлялось с помощью теста «открытое поле» [1]. Для данного теста используется специальная конструкция, представляющая собой белую арену высотой стенок 80 см и диаметром дна 1,5 м. Дно установки расчерчено на центральную и периферическую части, включающих в себя несколько секторов. Также площадка арены содержит небольшие отверстия, так называемые «норки», рассчитанные для анализа исследовательской деятельности самцов крыс. Передвижения крысы, помещённой в центр арены,

наблюдали в течение 10 мин. Эксперимент был поставлен в затемнённой, изолированной от постороннего шума комнате в одно и то же время суток.

При регистрации поведенческих параметров оценивали двигательную и исследовательскую активность, а также эмоциональный статус лабораторных животных [1]. За показатель горизонтальной двигательной активности принимали сумму количества пересечённых квадратов в различных зонах поля. Совокупность промежутков времени, когда у животного не наблюдалось состояния бодрствования, принимали за неподвижность. Наряду с ним, при обработке данных двигательной активности мы также выделяли такой параметр, как латентный период – неподвижность до первого двигательного действия.

Исследовательская деятельность оценивалась по числу вертикальных стоек на задних лапах в центре и на периферии. Общее количество актов обнюхивания специальных маленьких отверстий в поле также характеризовало исследовательскую активность.

Показателями, определяющими эмоциональный статус лабораторных крыс, являлись количество актов дефекации и уринации, число эпизодов груминга и его продолжительность в разных зонах экспериментального поля [7].

Статистическая обработка полученной информации выполнялась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни в программе Statistica v.10.0 (Stat Soft, США). Достоверными считались различия при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Тест «открытое поле» в последнее время считается одним из общеизвестных методов регистрации поведенческих параметров грызунов [1]. Установлено, что такие показатели, как количество пересечённых квадратов в различных зонах поля и общая неподвижность, дают оценку двигательной активности самцов крыс [3]. Данные наших исследований указывают на уменьшение количества пересечённых квадратов на периферии и в центре по сравнению с контрольной группой (табл.1). По длительности латентного периода мы наблюдали у экспериментальных крыс более продолжительное состояние неподвижности в отличие от контрольной группы: 165,40±13,07 против 52,45±3,06 сек. (при $p<0,05$). Также, в ходе всего тестирования самцы крыс линии Wistar (контрольная и экспериментальная группы) редко находились в центральной зоне, и наоборот, чаще посещали периферические сектора открытого поля.

Данные явления подтверждают наличие тревожности у опытных животных. Как известно, угнетение двигательной активности является следствием возникающего в ответ на стрессовую ситуацию защитного торможения [1].

Табл. 1. Параметры ориентировочно-исследовательского поведения самцов крыс линии Wistar в тесте «открытое поле» до и после воздействия низких температур.

Поведенческие показатели	контроль	опыт
Количество квадратов, пересечённых в центре, n	10,00±2,14	4,00±0,88
Количество квадратов, пересечённых на периферии, n	39,46±3,23	19,45±3,50*
Общее количество пересечённых квадратов, n	49,46±5,37	23,45±4,38*
Количество вертикальных стоек в центральном секторе, n	2,03±0,21	0,33±0,10
Количество вертикальных стоек на периферии, n	18,35±1,72	6,83±1,42*
Общее количество вертикальных стоек, n	20,38±1,93	7,16±1,52*
Общая неподвижность, сек	165,40±13,07	52,45±3,06*
Обнюхивание отверстий, n	14,25±1,23	5,70±0,55*

Примечание: *- статистически значимые различия при $p<0,05$.

Количественный анализ вертикальных стоек показал, что самцы после переохлаждения демонстрируют более низкий уровень исследовательской активности по сравнению с контрольной группой. Число вертикальных стоек в центре уменьшилось на 83,74%, а на периферии – на 62,78%. Количество обнюхиваний отверстий у опытных животных также снижалось.

Эмоциональное состояние животных характеризуют груминговая активность и количество болюсов и уринаций [7]. Из научных работ известно, что у грызунов толчком для активации груминга считается воздействие стресса. В тоже время различают комфортный (частые и менее длительные эпизоды груминга) и стрессорный (продолжительные акты с меньшей частотой) виды груминга [5]. Поэтому при анализе данного параметра мы регистрировали продолжительность и частоту актов груминга.

Представленные в таблице 2 данные указывают на достоверные различия в параметрах эмоциональности. При сравнении результатов группы контроль и после пятидневного воздействия холодового

фактора выявлено статистически значимое ($p<0,05$) снижение числа эпизодов и увеличение продолжительности груминга на периферии с 9,51±1,03 сек. до 6,30±0,75 сек. и с 165,15±5,98 сек. до 199,61±10,77 сек., соответственно. Так как комфортное поведение контрольных животных проявляется в частых, но недлительных актах груминга, а у крыс после воздействия низких температур эти параметры характеризовались малым количеством и большой продолжительностью эпизодов груминга, мы можем утверждать, что у опытных животных наблюдалось повышение уровня тревожности [2].

Вместе с тем под влиянием холода у крыс выявлялись частые акты дефекации и уринации по сравнению с контролем, что также дополнительно говорило о стрессовом состоянии животных (табл. 2).

Табл. 2. Показатели эмоциональности самцов крыс линии Wistar в тесте «открытое поле» до и после воздействия холода.

Поведенческие параметры	контроль	опыт
Продолжительность груминга в центре, сек	0	0
Продолжительность груминга на периферии, сек	165,15±5,98	199,61±10,77*
Общая продолжительность груминга, сек	165,15±5,98	199,61±10,77*
Количество эпизодов груминга в центре, n	0	0
Количество эпизодов груминга на периферии, n	9,51±1,03	6,30±0,75*
Общее количество эпизодов груминга, n	9,51±1,03	6,30±0,75*
Количество дефекаций, n	1,55±0,16	4,83±0,10*
Количество уринаций, n	1,44±0,40	1,98±0,22

Примечание: *- статистически значимые различия при $p<0,05$.

Исходя из результатов эксперимента, можно сделать заключение, что под воздействием низких температур происходит снижение ориентировочно-исследовательского поведения и увеличение показателей эмоциональности, свидетельствующие о повышении тревожности самцов крыс линии Wistar.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Калуев А.В. Изучение тревожности у животных - вчера, сегодня, завтра // Материалы 7-й междисциплинарной конференции по биологической психиатрии «Стресс и поведение». 2003. С. 144-147.

2. Сидоров К.Р. Тревожность как психологический феномен // Вестн. Удмурт. ун-та. 2013. С. 42-52.

3. Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В. и др. Определение уровня тревожности у крыс в тестах «открытое поле»,

«крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля II Бюл. эксп. биологии и медицины. 2013. Т. 155, № 3. С. 268-270.

4. Bowman R.E., MacLusky N.J., Sarmiento Y. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters // Endocrinology. 2004. No. 145 (8).

5. Celis, M. E. Measurement of Grooming Behaviour / M. E. Celis, E. Torre // In: Methods in Neurosciences, Ed Conn A., San Diego, New York: Academic Press, 1993. -P. 359-378.

6. Hajar El Marzouki, Youssef Aboussaleh, Mohamed Najimi, Fatiha Chigr, Ahmed Ahami The effect of cold stress on neurobehavioral and physiological parameters in rats // Frontiers in Physiology. 2021. Vol. 12.

7. La Bar K. S. Fear and Anxiety: Handbook of emotions. New York: The Guilford Press. 2016. P. 751-774.

8. Srikumar B.N., Raju T.R. The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioral recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats // Neuroscience. 2006. No. 143 (3). Pp. 679-688.

© Шамсутдинова Динара А., Шамсутдинова Дилара А., Садртдинова И.И., 2022

УДК: 612.084
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.35

РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНОГО ОТДЕЛА МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА МОЗГА В ФОРМИРОВАНИИ ПИЩЕВОГО И ПИТЬЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ САМОК КРЫС

© Юданова А.Д.*, Романова И.Д., Инюшкин А.Н.
Самарский национальный исследовательский университет
имени академика С.П. Королева, г. Самара, Россия
* judanova-nastja@rambler.ru

Миндалевидный комплекс головного мозга участвует в регуляции как деятельности отдельных органов и систем, так и целостных поведенческих актов, определяющих адаптацию организма, его половое, пищевое и агрессивно-оборонительное поведение. Наша цель состояла в том, чтобы изучить роль центральных структур миндалины в регуляции исследовательского, пищевого, питьевого и оборонительного поведения. Для исследования самок крыс, подвергнутых двусторонней электролитической деструкции центрального ядра миндалевидного комплекса (CEA), использовали следующие тестовые установки: «Тёмно-светлая камера», «Восьмилучевой радиальный лабиринт» и метод измерения количества выпитой жидкости. В результате эксперимент в «Тёмно-светлой камере» показал, что в условиях свободного выбора между пищевой приманкой и плацебо (мел) самки с разрушенным CEA всегда выбирали сыр и не исследовали пространство. Контрольные крысы - активно исследовали территорию установки, нюхали мел и приманку. «Восьмилучевой радиальный лабиринт» показал, что экспериментальная группа крыс во время тестирования обходила меньшее количество рукавов в поисках пищевой приманки. Контрольные животные сразу же находили сыр. Также после разрушения CEA потребление воды у животных увеличивалось. Таким образом, полученные данные указывают на важную роль CEA в организации исследовательской деятельности самок крыс и в выборе модели поведения в зависимости от ситуации, а также в регуляции питьевого поведения.

Ключевые слова: миндалевидный комплекс; пищевое поведение; питьевое поведение.

THE ROLE OF THE CENTRAL DEPARTMENT OF THE AMYGDALA OF THE BRAIN IN THE FORMATION OF EATING AND DRINKING BEHAVIOR OF FEMALE RATS

Yudanova A.D.*, Romanova I.D., Inyushkin A.N.[1]
Samara National Research University, Samara, Russia
* judanova-nastja@rambler.ru

The amygdala of the brain is involved in the regulation of both the activity of individual organs and systems, and holistic behavioral acts that determine the adaptation of the body, its sexual, nutritional and aggressive-defensive behavior. Our objective was to examine the role of the central structures of the amygdala in the regulation of research, nutritional, drinking and defensive behavior. The following methods «Light-dark transition test», «Eight-arm radial maze test» and method of measuring the amount of liquid consumed were used to study female rats subjected to bilateral electrolytic destruction of the Central nucleus of the amygdala (CeA). As a result, the experiment in the «Light-dark transition test» showed that under conditions of free choice between food bait and placebo, females with destroyed CeA always chose cheese and did not explore the space. Control rats - actively explored the space, sniffed chalk and bait. The «Eight-arm radial maze test» showed that the experimental group of rats during testing bypassed fewer arms in the search for food bait. The control animals immediately found the cheese. Also, after the destruction of CeA, the consumption of water in animals increased. In general, the data obtained indicate the important role of CeA in the organization of research activity of female rats and in choosing a model of behavior depending on the situation and in the regulation of drinking behavior.

Keywords: amygdala, eating behavior, drinking behavior.

Введение

Нейронная регуляция пищевого и питьевого поведения как важного фактора выживания является значимой областью исследований, поскольку данное поведение играет существенную роль в сохранении и улучшении здоровья. Пищевое и питьевое поведение физиологически контролируется с помощью процессов, связанных с потребностью в энергии и питательных веществах, а также сохранением водно-солевого баланса. К структурам мозга, управляющим висцеральными системами организма, относят миндалевидный комплекс, участвующий в формировании регуляции целостных поведенческих актов, которые, в свою очередь, определяют

адаптацию организмов, их половое, пищевое и агрессивно-оборонительное поведение [1,2,3,8] .

Вопрос о роли отдельных структур миндалевидного комплекса в организации пищевого и питьевого поведения все еще остается открытым, поэтому целью нашей работы является исследование роли центральных структур миндалины в регуляции данного поведения. Для достижения этой цели мы решили исследовать особенности пищевого и питьевого поведения на самках крыс с разрушенным центральным ядром миндалины.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 12 половозрелых небеременных самках лабораторных крыс, массой 250-300 грамм. Животных случайным образом распределяли на контрольную и экспериментальную группы по 6 особей в каждой. Животные содержались в идентичных условиях, стандартных для вивария при естественном освещении. Обе клетки убирались с определённой частотой и заполнялись подстилочным материалом. Пищевой рацион был одинаковым у крыс обеих групп и состоял из зерновых кормов, кисломолочных продуктов, мяса, яиц и воды в соответствии с рекомендациями по содержанию лабораторных животных [5].

У крыс экспериментальной группы под нембуталовым наркозом с дозой 75 мг/кг массы животного проводится двустороннее электролитическое разрушение центрального ядра электрическим током 1 мкА в течении 10 секунд в соответствии с координатами атласа Paxinos G., Watson Ch. (1998), а именно P= 1,8 мм, L= ±3,8 мм, V= 7,8 мм от точки брегмы [9]. У самок контрольной группы разрушение не осуществляется. В течение последующих двух недель осуществляется послеоперационный контроль раны, а также проводится асептические и антисептические мероприятия.

По прошествии 14 дней после операции, начинается этап исследований, в котором собираются и анализируются особенности пищевого и питьевого поведения у экспериментальных и контрольных крыс, используя при этом авторские модификации общепринятых методик исследования уровня тревожности, и исследовательской деятельности. Исследования проводятся после двухдневной пищевой депривации. Полученные данные обрабатываются статистически [6].

Тест «Тёмно-светлая камера» применяется в настоящее время как основная модель оценки тревожного поведения грызунов. Камера состоит из тёмного — «безопасного» — отсека и ярко освещённого открытого отсека, образующего, таким образом, зону «отвращения».

Модель создаёт конфликтную ситуацию для крысы, которая склонна исследовать незнакомую область, хотя, первоначально хочет избежать неизвестного. В данном исследовании в зону «отвращения» кладётся пищевая приманка, таким образом создавая конфликтное поведение. Интервал времени, проведённого в тёмном отсеке, коррелирует с уровнем тревожности, тогда как число выходов и время обследования освещённого отсека—показатели склонности к риску и исследовательской активности [7].

В тестовой установке «Тёмно-светлая камера» крыс помещают в темную часть отсека, а в разные углы светлого отсека помещаются съедобный и несъедобные объекты, в нашем случае кусочек сыра и кусочек мела соответственно. В течение 10 мин регистрируются такие показатели, как латентное время выхода всеми лапами в светлый отсек, количество выглядываний из тёмной камеры, выбор между объектами, а также был ли поглощён выбранный объект. После каждого тестирования установку протирают спиртовым раствором. Во время проведения эксперимента осуществляется полная тишина.

Тестовая установка «Восьмилучевой радиальный лабиринт» предназначена для исследования выбора животного оптимальной стратегии нахождения пищи. В классическом виде представляет собой восьмилучевой лабиринт с центральной площадкой. Тест основан на рефлексе избегания больших ярко освещенных пространств (каковым является центральная площадка) и предпочтении узких затемнённых укрытий [7].

В один из восьми рукавов помещается пищевая приманка (кусочек сыра). В центр лабиринта сажается крыса, прошедшая период депривации в 2 суток. В течении 10 минут регистрируется исследовательская активность животного. После каждого тестирования установку протирали спиртовым раствором. Во время проведения эксперимента осуществлялась полная тишина.

Исследование питьевого поведения крыс проводилось методом измерения выпитой жидкости. В клетки с контрольной и экспериментальной группами, с 6 особями в каждой, помещали одинаковое количество воды со свободным доступом. Ежедневно, в течение недели проводились измерения оставшейся жидкости, после чего рассчитывалось количество выпитого. Методика измерения выпитой жидкости позволила зафиксировать результаты свободного употребления воды крысами контрольной и экспериментальной групп.

Результаты и обсуждение

В тестовой установке «Тёмно-светлая камера» после посадки животного в тёмный отсек камеры проводилась регистрация некоторых значений. Средняя величина латентного времени выхода крыс экспериментальной группы равняется 20,2 с, за которые они выглянули в светлый отсек в среднем 1,6 раз все крысы вышли из «безопасного» отсека, четыре из пяти сделали выбор в пользу съедобного объекта и все ели сыр.

Крысы контрольной группы находились в тёмной камере в среднем 254,8с, за которые успевали сделать определённое количество выглядываний, среднее значение которых приравнивается к 5,5 раз. В итоге тёмный отсек покинули четыре из шести животных и только двух привлёк сыр, тем не менее ни одна не решилась съесть его.

Статистическая обработка показала различия во взаимодействии с объектом: поедание его экспериментальными крысами (пять из пяти) и только его обнюхивание контрольными животными (четыре из четырёх) $p < 0{,}01$, Fisher Test. Данные значения представлены в таблице 1.

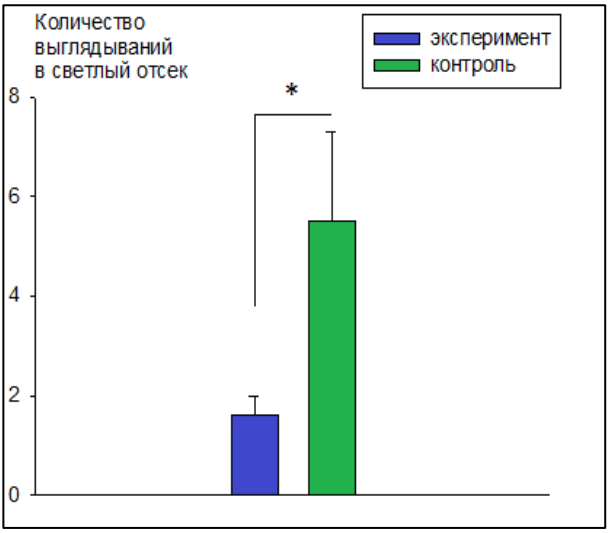
Табл. 1. Результаты исследования влияния центральной амигдалэктомии на поведение самок крыс в тестовой установке «Тёмно-светлая камера».

	Латентное время реакции, с	Число покинувших тёмный отсек	Выбор		Поедание приманки **
			Сыр	Мел	
Контрольная группа	254,8	4	2	2	0
Экспериментальная группа	20,2	5	4	1	5

* – $p < 0{,}05$,

** – $p < 0{,}01$ статистически значимое отклонение

При проведении статистической обработки результатов было выяснено, что среднее значение количества выглядываний в экспериментальной группе получается 1,6±0,4 ($p < 0{,}05$, t-test), а в контрольной группе 5,5±1,8 ($p < 0{,}05$, t-test) (рис. 1).



* – p <0,05 статистически значимое отклонение

Рис. 1. Количество выглядываний в светлый отсек крысами экспериментальных (синий столбец) и контрольных (зелёный столбец) групп в тестовой установке «Тёмно-светлая камера».

В «Радиальном восьмилучевом лабиринте» крысы экспериментальной группы при посадке за 389,2с обошли в среднем 5,3 рукавов лабиринта. При этом пищевую приманку нашли четыре из шести крыс.

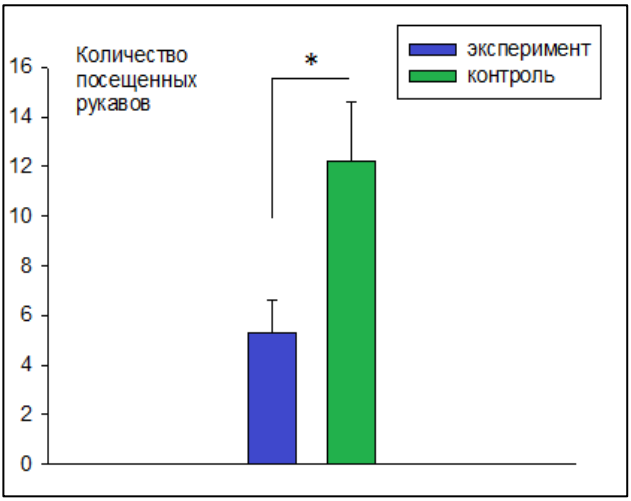
Животные контрольной группы после посадки обошли в среднем 12,2 рукавов за 401,0с. Нашли пищевую приманку пять из шести крыс. Данные значения представлены в таблице 2.

Табл. 2. Результаты исследования влияния центральной амигдалэктомии на поведение самок крыс в тестовой установке «Радиальный восьмилучевой лабиринт».

	Время, затраченное на обнаружение приманки, с	Обнаружение приманки	Поедание приманки
Контрольная группа	401,0	6	4
Экспериментальная группа	389,2	4	4

При проведении статистической обработки результатов было выяснено, что среднее значение количества обойдённых рукавов в

экспериментальной группе 5,3±1,3 (p <0,05, t-test), а в контрольной группе 12,2±2,4 (p <0,05, t-test) (рис. 2).



* – p <0,05 статистически значимое отклонение

Рис. 2. Количество посещённых рукавов крысами экспериментальных (синий столбец) и контрольных (зелёный столбец) групп в тестовой установке «Радиальный восьмилучевой лабиринт».

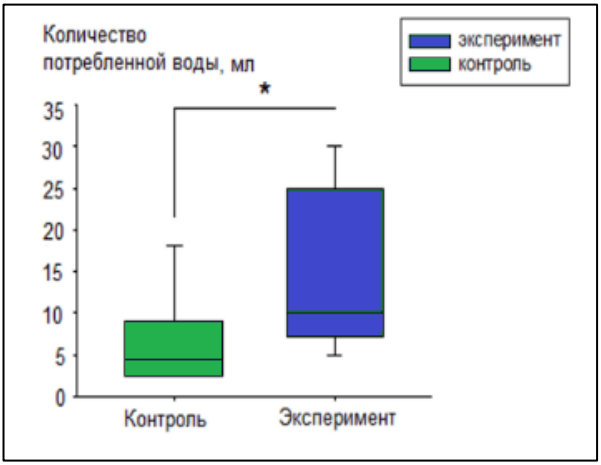
При сравнении количества выпитой воды контрольной и экспериментальной группами было выявлено, что самки крыс с амигдалэктомией потребляли большее количество жидкости, в отличие от интактных животных. Среднее количество потребляемой воды крысой экспериментальной группы равняется 17,7 мл, а контрольной – 9,2 мл. Данные значения представлены в таблице 3.

Табл. 3. Количество воды, потребленной крысами за неделю.

	Потребление воды за неделю 1 крысой, мл *
Контрольная группа	9,2
Экспериментальная группа	17,7

* – p <0,05 статистически значимые различия

При проведении статистической обработки результатов было выяснено, что среднее количество выпитой воды в экспериментальной группе 17,7 мл (Median = 10,0), а в контрольной группе 9,2 мл (Median = 4,5) (p <0,05, Mann-Whitney Test) (рис. 3).



* – p <0,05 статистически значимые различия

Рис. 3. Количество потреблённой воды крысами экспериментальных (синий столбец) и контрольных (зелёный столбец) групп.

Проводя эксперимент в «Тёмно-светлой камере», мы заметили, что у контрольной группы крыс исследовательская и оборонительная активность подавляла пищевое поведение, когда у амигдалэктамированных животных такой тип поведения не наблюдался, направляясь к еде, они распознавали сыр как знакомый объект. Для экспериментальных животных большим стрессирующим фактором являлась незнакомая среда и когда в данной среде появлялся знакомый стимул, коим являлся сыр, они теряли интерес к окружающей обстановке и начинали реализовывать поведение, связанное с появившимся стимулом — либо прятаться в убежище, либо есть. У контрольной группы при выглядывании из тёмного отсека камеры срабатывало оборонительное поведение, в то время как экспериментальные, заметив знакомый объект, сразу направлялись к нему.

Подводя итог эксперимента в «Радиальном восьмилучевом лабиринте» можно сделать вывод о том, что экспериментальная группа

крыс при тестировании обошла меньше рукавов в поиске пищевой приманки. Контрольные животные сразу находили сыр. У животных с разрушенным СЕА преобладало поисковое поведение, в то время как у контрольных — исследовательское.

В «Радиальном восьмилучевом лабиринте» у животных контрольной группы преобладает исследовательское поведение, пища не является для них значимой приманкой, а у экспериментальных — исследовательское поведение проявляется в меньшей степени, и они либо находят еду, либо остаются в рукаве, который расценивают как убежище. Экспериментальная группа в условиях выбора всегда предпочитают любой вид активности — спрятаться или съесть. Их поведение становится почти дизадаптивным. При разрушении СЕА страдает прежде всего ориентировочная исследовательская активность.

При исследовании питьевого поведения мы сравнили количество выпитой воды экспериментальной и контрольной группами. После разрушения СЕА у животных увеличивается потребление воды. Следовательно, это может указывать на сильное влияние центрального отдела МК на регуляцию питьевого поведения. Что также может объясняться падением артериального давления при разрушении СЕА, что соответственно приводит к общему увеличению потребления воды и носит компенсаторный характер [4].

Этические положения. При проведении эксперимента все этические правила при работе и содержанию животных были соблюдены в соответствии с биоэтическими нормами и действовали в рамках Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, заключенной 18 марта 1986 г. в Страсбурге, и одобрены комиссией по биоэтике биологического факультета Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева (протокол № 3 от 20 июня 2020 года).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Амигдалофугальная модуляция вегетативных центров мозга / О.А. Любашина, С.С. Пантелеев, А.Д. Ноздрачев. СПб.: Наука, 2009.
2. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс как нейроэндокринный репродуктивный центр мозга: фундаментальные закономерности структурно-функциональной организации как основа для развития прикладных разработок и новых инновационных

технологий // Научное обозрение. Медицинские науки. 2016. №6. – С. 15-31.
3. Ахмадеев А. В., Калимуллина Л.Б. Центральное ядро миндалевидного комплекса мозга: структура, нейрохимия, связи и функции // Успехи физиологических наук. 2020. Т. 51. № 3. С. 1-17.
4. Бакулина Е. И., Юданова А. Д., Романова И. Д., Инюшкин А.Н. Роль центральных отделов миндалевидного комплекса мозга в процессах регуляции гемодинамики крыс на фоне стресс-реакции // Интегративная физиология. 2021. Т. 2. № 4. С. 455-462.
5. Лабораторные крысы: содержание, разведение, кормление и использование в биомедицинских исследованиях: учеб. пособие / В.И. Беляков, Е.М. Инюшкина. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2008.
6. 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.
7. Нотова С. В., Казакова Т. В., Маршинская О. В. Современные методы и оборудование для оценки поведения лабораторных животных (обзор) // Животноводство и кормопроизводство. 2018. Т. 101. №1. С. 106-115.
8. Smith, C.M. Phenotyping neurons activated in the mouse brain during restoration of salt debt // J. Chem. Neuroanat. 2019. Vol. 101. URL: https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101665
9. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, Ch. Watson. [4th ed]. San Diego: Academic Press, 1998. P. 22.

© Юданова А.Д., Романова И.Д., Инюшкин А.Н., 2022

УДК: 611.814.53; 611.811.018
DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.36

ОСОБЕННОСТИ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ЭПИФИЗА ЧЕЛОВЕКА

© Яковлев В.С.[1,2], Суфиева Д.А.[1*], Разенкова В.А.[1], Григорьев И.П.[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», г. Санкт-Петербург
* dinobrione@gmail.com

Аннотация. Эпифиз является нейроэндокринной железой, ответственной за выработку мелатонина и регуляцию биоритмов в организме. Эпифиз относится к одному из циркумвентрикулярных органов – структур головного мозга, которые лишены гематоэнцефалического барьера. Капилляры в этих органах представлены фенестрированным типом. Данное исследования направлено на изучение особенностей васкуляризации эпифиза человека с применением современных иммуногистохимических и морфометрических методов. Было установлено, что сосудистые элементы, как правило, локализуются в соединительнотканных трабекулах и формируют кластеры сосудов. В дольках эпифиза сосуды встречаются крайне редко, кластеры в этой области не идентифицируются.

Ключевые слова: эпифиз, васкуляризация, фактор Виллебранда, человек, иммуногистохимия

VASCULARIZATION OF HUMAN PINEAL GLAND: MORPHOLOGICAL ASPECTS

Yakovlev V.S.[1,2], Sufieva D.A.[1]*, Razenkova V.A.[1], Grigor’ev I.P.[1]

[1] Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg
[2] A. I. Herzen Russian State Pedagogical University, Saint Petersburg
* dinobrione@gmail.com

Abstract. The pineal gland is a neuroendocrine gland responsible for the melatonin production and the regulation of biological rhythms in the body. The pineal gland refers to one of the circumventricular organs -

structures of the brain that lack the blood-brain barrier due to the presence of fenestrated capillaries. This research is aimed at studying the morphological features of human pineal gland vascularization using up-to-date immunohistochemical and morphometric methods. It was found that the vascular elements are localized predominantly in connective tissue septae and form clusters of vessels. In the lobules of the pineal gland, the vessels are extremely rare; clusters in this area are not identified.

Keywords: pineal gland, vascularization, von Willebrand factor, human, immunohistochemistry

Введение

Эпифиз (шишковидное тело, пинеальная железа) является железой внутренней секреции. В организме человека эта железа отвечает за регуляцию суточного и сезонного периодизма физиологических процессов, что обеспечивается циркадными колебаниями синтеза и секреции мелатонина. Уровень мелатонина имеет прямое влияние на функционирование всей гипоталамо-гипофизарной системы. Кроме того, рецепторы к мелатонину есть на многих внутренних органах, что указывает на важную роль этого гормона в поддержании физиологических процессов в организме, в частности в работе иммунной системы, репродуктивной функции, реакции организма на стресс. Эпифиз является частью эпиталамуса и локализован между передними буграми четверохолмия поверх третьего мозгового желудочка. У взрослого человека в норме масса этой железы составляет около 0,2 г, а длина не превышает 15 мм [1, 2].

Снаружи шишковидное тело покрыто соединительнотканной капсулой. От неё в толщу органа отходят перегородки (трабекулы), в которых расположены кровеносные сосуды. Эти перегородки разделяют паренхиму эпифиза на дольки. Паренхима эпифиза состоит преимущественно из пинеалоцитов и глиоцитов. Пинеалоциты содержат большое ядро с крупными ядрышками и имеют отростки, переплетающиеся с отростками глиальных клеток. Отростки пинеалоцитов контактируют с кровеносными капиллярами. Глиоциты представлены преимущественно астроцитами, также присутствуют микроглиоциты и олигодендроциты [3, 4, 5].

Эпифиз богато васкуляризирован. Некоторые авторы утверждают, что это второй по степени васкуляризации орган в организме человека после почек. Эпифиз относится к циркумвентрикулярным органам - структурам головного мозга, которые лишены гематоэнцефалического барьера. Капилляры в этих органах относятся к фенестрированному типу, что облегчает

поступление синтезируемых эпифизом гормонов в кровоток [4]. Несмотря на то, что проводится много исследований строения, функций и цитоархитектоники эпифиза, вопросам организации сосудистой системы этого органа уделено незаслуженно мало внимания, а работы, посвященные исследованию эпифиза у человека, единичны. Современные иммуногистохимические подходы с последующим морфометрическим анализом открывают широкие перспективы в изучении организации сосудистой системы эпифиза животных и человека. Целью настоящего исследования стало изучить с помощью иммуногистохимической реакции к фактору Виллебранда и морфометрического анализа организацию сосудов эпифиза человека.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили парафиновые срезы эпифиза человека (n=5) возрастом 16-41 год из архивного материала Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ». При архивации материала соблюдались все необходимые этические нормы (заключения локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» № 58-9/1-684 от 11.12.2009 и № 2/22 от 06.04.2022). Образцы фиксировали в этанол-формалине или цинк-этанол-формалине. Изготавливали парафиновые срезы толщиной 7 мкм. Для иммуногистохимического исследования в качестве первичных антител применяли кроличьи поликлональные антитела против фактора Виллебранда, vWF (разведение 1:1000, Agilent, США), который выявляет эндотелий кровеносных сосудов. В качестве вторичных антител использовали реагент из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Подкраску срезов осуществляли с помощью квасцового гематоксилина Карацци (ЛабПоинт, Россия), либо альцианового синего (1% водный раствор, Sigma-Aldrich, США). Анализ препаратов проводили с помощью светового микроскопа Leica DM750. Плотность распределения сосудов оценивали морфометрически с помощью кластерного анализа. Для этого использовали плагин SSIDC Cluster Indicator для ImageJ, основанный на алгоритме DBSCAN. Значения параметров ε и минимальная плотность частиц (minDensity) были равны 50 пикселей и 3 объекта соответственно.

Результаты и обсуждение

Иммуногистохимическое исследование эпифиза человека с помощью реакции к vWF показало, что реакция наблюдается в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, расположенных в

соединительнотканных трабекулах, окружающих дольки эпифиза. Были обнаружены как артериолы и венулы, так и капилляры. Единичные окрашенные сосуды встречаются в паренхиме долек (рис. 1А). Согласно литературным данным кровоснабжение эпифиза осуществляется задними хориоидальными артериями и внутренними мозговыми венами. Капиллярная сеть имеет следующие особенности: крупные и синусоидные капилляры образуют сеть внутри соединительнотканных перегородок, окружающих дольки. От этой сети отходят капиллярные петли, проникающие в центр долек [6]. Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, демонстрируют наличие фактора Виллебранда в кровеносных сосудах соединительнотканных перегородок, однако этот белок практически не встречался в капиллярной сети внутри долек эпифиза. Возможно, это связано с тем, что капилляры в этой области фенестрированного типа, и в их эндотелиоцитах практически не присутствуют тельца Вейбеля-Палада. Так, в работе Pusztaszeri (2006) также было показано, что фенестрированные капилляры почечных клубочков человека не содержат фактор Виллебранда [7]. Рядом авторов продемонстрировано, что vWF распределен неоднородно по всей сосудистой сети, его экспрессия может отличаться между эндотелиальными клетками в пределах органа (мозаичная экспрессия) [8]. Локальные вариации уровня экспрессии гена *VWF* в эндотелиальных клетках зависят от изменений в регуляции транскрипции этого гена. Так, например, метилирование ДНК в промоторных участках гена приводят к подавлению его экспрессии в эндотелиоцитах [9]. Таким образом, сосуды как одного, так и разных типов в одном органе могут отличаться по наличию или отсутствию в эндотелиоцитах vWF. Дальнейшие исследования смогут пролить свет на характер экспрессии этого фактора в сосудах разных типов и разных органов.

Кластерный анализ позволил определить плотность распределения кровеносных сосудов в эпифизе (рис. 1Б). Было установлено, что при заданных параметрах (ε-окрестности равна 50 и минимальной плотности частиц — 3) кластеры сосудов выявлялись только в междольковой соединительной ткани, в то время как в паренхиме кластеры обнаружены не были. Эти данные могут говорить о том, что в трабекулах плотность расположения сосудов высокая, и представлена как главными (более крупными), так и вторичными (более мелкими) ветвями для обеспечения обильного кровоснабжения органа, в то время как в паренхиме эпифиза сосуды представлены скорее одиночными ветвями (капиллярами).

Иммуногистохимический метод с применением кластерного анализа позволяет не просто описать локализацию и морфологию кровеносных сосудов, но и дает возможность провести сравнительный анализ плотности распределения сосудов в разных структурах с дальнейшим проведением статистического анализа для установления различий в уровне кровоснабжения разных органов. Измерение плотности распределения сосудов также может служить прогностическим критерием при исследовании злокачественных трансформаций [8].

Таким образом, с помощью ИГХ-реакции на vWF дано описание структуры сосудистого русла эпифиза человека. Было установлено, что сосудистые элементы, как правило, локализуются в соединительнотканных трабекулах и крайне редко выявляются в паренхиме пинеальной железы. Морфометрический анализ также показал, что кластеризация сосудов типична только для сосудов, расположенных в трабекулах, в то время как в дольках эпифиза кластеры сосудов выявлены не были.

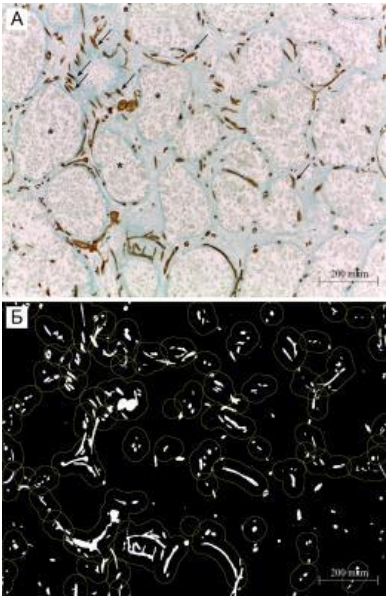


Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии, характеризующие васкуляризацию эпифиза человека. А — эпифиз человека, малое увеличение. Иммуногистохимическая реакция на фактор Виллебранда с подкраской альциановым синим. Стрелки указывают на кровеносные

сосуды, звездочка — дольки эпифиза. Б — эпифиз человека, малое увеличение, преобразованное методом кластеризации по плотности (алгоритм DBSCAN) при ε-окрестности равной 50 и минимальной плотности частиц 3. Рамки (желтый цвет) ограничивают предполагаемые кластеры.

Информация о финансировании работы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25- 20051, https://rscf.ru/project/22-25-20051/ и гранта Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 14.04.2022 г. № 47/2022.

Этические положения.

Материал головного мозга человека получен из архива Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ», при архивации материала соблюдались все необходимые этические нормы (заключения локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» № 58-9/1-684 от 11.12.2009 и № 2/22 от 06.04.2022).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Gheban B.A., Rosca I.A., Crisan M. The morphological and functional characteristics of the pineal gland // Med Pharm Rep. 2019. Vol. 92. No 3. Pp. 226-234.
2. Юнеман О.А. Морфологическая организация эпифиза и сосудистого сплетения III желудочка головного мозга человека // Морфологические ведомости. 2012. № 3. С. 97-100.
3. Волков В.П. Возрастная функциональная морфология пинеальной железы // Современная медицина: актуальные вопросы. 2014. № 34. – С. 15-28.
4. Шилова А.В., Ананьева Н.И., Сафонова Н.Ю., Лукина Л.В. Эпифиз: варианты строения и их роль в возникновении неврологических и психических расстройств // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2022. Т. 16. № 1. С. 39-45.
5. Григорьев И.П., Фёдорова Е.А., Суфиева Д.А., Коржевский Д.Э. Иммуногистохимическое исследование клеточной организации эпифиза человека // Морфология. 2020. Т. 158. № 4-5. С. 19-26.

6. Duvernoy H.M., Parratte B., Tatu L., Vuillier F. The human pineal gland: relationships with surrounding structures and blood supply // Neurol Res. 2000. Vol. 22. No 8. Pp. 747-790.
7. Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues // J Histochem Cytochem. 2006. Vol. 54. No 4. Pp. 385-395.
8. Zanetta L., Marcus S.G., Vasile J., Dobryansky M., Cohen H., Eng K., Shamamian P., Mignatti P. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis // Int J Cancer. 2000. Vol. 85. No. 2. Pp. 281-288.
9. Yuan L., Chan G., Beeler D. et al. A role of stochastic phenotype switching in generating mosaic endothelial cell heterogeneity // Nat Commun. 2016. Vol. 7. Pp. 10160

© Яковлев В.С., Суфиева Д.А., Разенкова В.А., Григорьев И.П., 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

В ПАМЯТЬ О КАЛИМУЛЛИНОЙ ЛИЛИИ БАРЫЕВНЕ

Хисматуллина З.Р., Ахмадеев А.В., Федорова А.М. 3

ВЛИЯНИЕ ЦЕНТРАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ МИНДАЛИНЫ НА РЕГУЛЯЦИЮ ГЕМОДИНАМИКИ КРЫС В ПОКОЕ И ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КЛЮКОКОРТИКОИД-ИНДУЦИРОВАННОГО СТРЕССА

Бакулина Е.И., Романова И.Д. 11

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ИНСУЛИНА СНИЖАЕТ АУТОФАГИЧЕСКУЮ, АПОПТОТИЧЕСКУЮ И ОБЩУЮ ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА КРЫС И РЕПЕРФУЗИИ, ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

Баюнова Л.В., Захарова И.О., Илясов И.О., Аврова Д.К., Фокина Е.А, Аврова Н.Ф. 20

РЕАКЦИИ ДЫХАНИЯ НА МИКРОИНЪЕКЦИИ БАКЛОФЕНА И 2-ГИДРОКСИСАКЛОФЕНА В РЕТРОТРАПЕЦИЕВИДНОЕ ЯДРО У КРЫС

Будаев А.И., Конашенкова А.Т., Ведясова О.А., Ковалева Т.Е. 36

СРАВНЕНИЕ МАТЕРИНСКОЙ РЕАКЦИИ КРЫС ЛИНИЙ WISTAR И WAG/RIJ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГАЛОПЕРИДОЛА В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Буянова А.А., Садртдинова И.И. 46

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ТКАНИ ОТДЕЛОВ КОНЕЧНОГО МОЗГА КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Щербицкая А.Д., Милютина Ю.П., Арутюнян А.В. 54

ФАКТОРЫ РИСКА ОСТРЫХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Габдулвалеева Э.Ф., Адзитарова А.Р. 62

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ В САМОРЕГУЛЯЦИИ ПОВЕДЕНИЯ У ПСИХИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДОВ

Давыдова Ю.Д., Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Мустафин Р.Н., Лобаскова М.М., Тахирова З.Р., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К. 69

УРОВНИ ИНСУЛИНА И ЛЕПТИНА В КРОВИ И ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, ЛЕЧЕНЫХ МЕТФОРМИНОМ, ИНТРАНАЗАЛЬНЫМ ИНСУЛИНОМ И ИНГИБИТОРОМ ФОСФАТАЗЫ 1В

Деркач К. В., Бондарева В. М. ,Сорокоумов В.Н. , Шпаков А.О. 81

ВЛИЯНИЕ ЛЕЧЕНИЯ САМЦОВ КРЫС С «НЕОНАТАЛЬНОЙ» МОДЕЛЬЮ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА С ПОМОЩЬЮ МЕТФОРМИНА И ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ИНСУЛИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФУНКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Деркач К. В., Иванцов А.О., Бондарева В.М., Шпаков А.О. 91

ВОЗБУЖДЕНИЕ АБСАНСА В РАДИОТЕХНИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ТАЛАМО-КОРТИКАЛЬНОЙ СЕТИ МОЗГА

Егоров Н.М., Кульминский Д.Д., Сысоев И.В., Пономернко В.И., Сысоева М.В. 102

РАЗРАБОТКА МЕТОДА АВТОМАТИЧЕСКОЙ РАЗМЕТКИ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ У КРЫС-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Ершова А.С., Грищенко А.А., Сулейманова Е.М., Виноградова Л.В., Сысоев И.В. 111

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА КИССПЕПТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В УСТАНОВКЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»

Журавлева М.А., Инюшкин А.Н. 118

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ДЕСТРУКТИВНЫМ ПАНКРЕАТИТОМ И В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Имаева А.К., Батыршина Э.Р., Фазлыахметова М.Я. 126

ИНСУЛИН КАК МОДУЛЯТОР СПАЙКОВОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ЦИРКАДИАННОГО ОСЦИЛЛЯТОРА СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА

Инюшкин А.Н., Мистрюгов К.А., Романова И.Д., Исакова Т.С., Инюшкина Е.М. 134

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОСОНТЕРАПИИ НА КУРЯЩИХ И НЕКУРЯЩИХ МОЛОДЫХ ЛЮДЕЙ

Инюшкина Е.М., Лазаренко Ю.Г., Коломеец Д.С., Тулина Н.А., Инюшкин А.Н. 144

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИЯ МАР 2, ВИМЕНТИНА И НЕСТИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ И ПОВТОРНОЙ ОСТРОЙ ТРАВМЕ МЕЗЕНЦЕФАЛОНА МОЛОДИ КЕТЫ ONCORHYNCHUS KETA

Капустянов И.А, Пущина Е.В., Вараксин А.А. 151

МИКРОГЛИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

Колос Е.А., Коржевский Д.Э. 164

СИСТЕМНОЕ ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛА НА СТРУКТУРУ НЕРВНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ВЫНУЖДЕННОЙ АНАЭРОБНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Лебедева А.И., Гареев Е.М., Сироткина И.В., Галаутдинов М. Ф., Муслимов С.А. 170

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ И ИХ МОДУЛЯЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ

Наймушина Л.Д., Аисансе Манджоло Тчанг, Ив Нсала Лемба, Беляков В.И. 184

ЭВОЛЮЦИЯ КОНЕЧНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обухов Д.К., Пущина Е.В., Цехмистренко Т.А.. 191

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОСТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ВИСОЧНО-ТЕМЕННО-ЗАТЫЛОЧНОЙ ПОДОБЛАСТИ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА ДЕТЕЙ ОТ РОЖДЕНИЯ ДО 12 ЛЕТ

Омар С., Цехмистренко Т.А., Васильева В.А., Обухов Д.К. 203

СЕЗОННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА И ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ У СТУДЕНТОВ С РАЗНЫМИ ХРОНОТИПАМИ

Павленко С.И., Ведясова О.А., Инюшкин А.А. 214

IBA-1-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ В СЕДАЛИЩНОМ НЕРВЕ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Петрова Е.С., Колос Е.А. 226

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОГЕНЕЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ МЕЗЕНЦЕНЦЕФАЛОНА МОЛОДИ ТИХООКЕАНСКОЙ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA*

Пущина Е.В., Капустянов И.А., Стуканева М.Е., Вараксин А.А., Обухов Д.К. 231

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЛАНОКОРТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1-ГО ТИПА В НЕЙРОНАХ *LOCUS COERULEUS* МЫШИ C57BL/6J

Романова И.В., Михайлова Е.В., Михрина А.Л. 244

ЦИТОМОРФОЛОГИЯ СПИННОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ КУР

Сковородин Е.Н., Вехновская Е.Г. 253

ИЗМЕНЕНИЯ РЕАКТИВНОГО ПРОФИЛЯ АСТРОЦИТОВ ПЕРЕДНЕГО КОРТИКАЛЬНОГО ЯДРА АМИГДАЛЫ У КРЫС С АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ В ОТВЕТ НА ГОНАДЭКТОМИЮ

Файрушина А.И., Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р. 273

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА В АНТЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

Федорова А.М., Давлетбаева А.Р., Хисматуллина З.Р. 280

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ КОННЕКСИНА 43

Филиппов М.С., Коржевский Д.Э. 289

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ CART-ПЕПТИДА В МИНДАЛЕВИДНОМ ТЕЛЕ МОЗГА КРЫС ЛИНИИ DAT-KO

Хисматуллина З.Р., Садртдинова И.И. 299

ПАРОДОКСАЛЬНОЕ СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ ТРЕВОЖНОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ У КРЫС: УНИКАЛЬНАЯ РОЛЬ НЕЙРОБИОЛОГИИ ГИППОКАМПА

Цейликман В.Э., Цейликман О.Б., Акулов А.Е., Шевелев О.Б., Хоцкина А.С., Концевая Г.С., Мошкин М.П., Завьялов Е.Л. 305

ИЗУЧЕНИЕ ИННЕРВАЦИИ СТЕНКИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ КРЫСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕЙРАЛЬНЫХ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Чумасов Е.И., Петрова Е.С. 318

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРЫС ЛИНИИ WISTAR ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»

Шамсутдинова Динара А., Шамсутдинова Дилара А., Садртдинова И.И. 325

РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНОГО ОТДЕЛА МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА МОЗГА В ФОРМИРОВАНИИ ПИЩЕВОГО И ПИТЬЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ САМОК КРЫС

Юданова А.Д., Романова И.Д., Инюшкин А.Н. 332

ОСОБЕННОСТИ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ЭПИФИЗА ЧЕЛОВЕКА

Яковлев В.С., Суфиева Д.А., Разенкова В.А., Григорьев И.П. 342