

На правах рукописи

Першина Екатерина Викторовна

**РОЛЬ МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ГИППОКАМПА,
ВЫЗВАННЫХ НЕЙРОТОКСИНАМИ**

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ПУЩИНО – 2019

Работа выполнена в лаборатории экспериментальной нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), г. Пущино.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Архипов Владимир Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Зайченко Мария Ильинична
(в.н.с. лаборатории условных рефлексов и физиологии эмоций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва)

доктор биологических наук
Воробьев Василий Васильевич
(в.н.с. лаборатории клеточных механизмов патологии памяти Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пущино)

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра высшей нервной деятельности (г. Москва)

Защита диссертации состоится «___» декабря 2019 г. в 15 часов на заседании совета Д 002.093.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://iteb.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат физико-математических наук

Н.Ф.Ланина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Нейродегенерация – процесс прогрессивной потери структуры и функции нейронов, в конечном результате приводящий к их гибели. Для нейродегенеративных болезней характерны две основных особенности – прогрессирующий характер структурно-функциональных нарушений мозга и селективная гибель определенного типа нейронов (Fu *et al.*, 2018). К сожалению, до настоящего времени не существует эффективной терапии нейродегенеративных заболеваний, поэтому актуальной задачей биомедицины остается исследование механизмов инициации и развития нейродегенеративных процессов в мозге, вызванных различными повреждающими факторами. Экспериментальные исследования на животных – необходимый этап для разработки эффективных нейропротекторов.

Литературные данные показывают, что нейродегенерация различной этиологии сопровождается окислительным стрессом, митохондриальными дисфункциями, нейровоспалением. Одним из общих механизмов, характерных для многих нейродегенеративных болезней, является эксайтотоксичность, возникающая вследствие избыточного количества внеклеточного глутамата и чрезмерной активации глутаматных рецепторов. Эксайтотоксичность является общим компонентом не только для многих нейродегенеративных заболеваний, она наблюдается также при ишемическом повреждении мозга и механических травмах. В результате исследований механизмов эксайтотоксичности было предложено несколько направлений для разработки протективных средств. Например, в экспериментах на моделях снижение эксайтотоксичности было достигнуто через прямое влияние на ионотропные рецепторы глутамата, активацию транспортеров глутамата, осуществляющих захват нейромедиатора из синаптической щели, блокаду поступления ионов кальция в нейроны. Однако, эти подходы оказались недостаточно эффективными и/или обладали нежелательными побочными эффектами в клинике (van der Staay *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2004; Chao *et al.*, 2010; Szydłowska *et al.*, 2010). Одна из причин такой ситуации, по-видимому, заключается в чрезвычайно важной роли глутамата и его рецепторов во всех функциях мозга. Известно, что все клетки мозга имеют рецепторы к глутамату и примерно половина нейронов используют глутамат как нейротрансмиттер, поэтому любое изменение активности рецепторов глутамата неизбежно влияет на многие структурно-функциональные параметры деятельности мозга. Глутамат реализует свое действие через ионотропные и метаботропные рецепторы. На основании сходства нуклеотидных последовательностей, метаботропные рецепторы глутамата (мГлу) были разделены на три группы, внутри которых идентичность последовательностей достигает 70% и падает до 45% между группами: Группа I: мГлу1, мГлу5; Группа II: мГлу2, мГлу3; Группа III: мГлу4, мГлу6-8. Эти рецепторы осуществляют тонкую

настройку синаптической нейротрансмиссии в нейрональных цепях мозга, играя важную роль в развитии нервной системы, в регуляции когнитивной деятельности, двигательной активности, механизмах пластичности (Nicoletti *et al.*, 2011). Рецепторы мГлу привлекли внимание как перспективные мишени для терапии развивающейся нейродегенерации. Лиганды к этим рецепторам показали значительный потенциал не только для снижения гибели нейронов, но также для терапии депрессии, наркомании, шизофрении и других нейробиологических заболеваний (Bruno *et al.*, 2017).

В настоящей работе исследовали роль мГлу рецепторов в развитии экспериментальной нейродегенерации, вызванной каиновой кислотой или хлоридом триметилолова в гиппокампе крыс.

Цели и задачи исследования

Цель работы заключалась в изучении роли отдельных подтипов мГлу рецепторов в условиях развития нейродегенерации, предполагая возможность снижения гибели нейронов с помощью фармакологической регуляции активности этих рецепторов.

Для решения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оптимизировать экспериментальные модели нейродегенеративных процессов в гиппокампе, вызванных применением нейротоксинов - каиновой кислоты или хлорида триметилолова.
- 2) Провести морфологические исследования гибели клеток в гиппокампе через разные периоды после однократного воздействия нейротоксином.
- 3) Исследовать когнитивные функции у животных после действия токсинов.
- 4) Исследовать уровни экспрессии генов представителей трёх групп мГлу рецепторов в гиппокампе крыс на разных этапах нейродегенерации.
- 5) Определить соотношение между фармакологической модуляцией активности мГлу рецепторов и уровнем экспрессии их генов.
- 6) Определить, какие подтипы мГлу рецепторов могут быть рассмотрены в качестве мишеней для создания эффективных средств снижения нейродегенеративных процессов в гиппокампе.

Научная новизна работы

Впервые в динамике показано вовлечение всех трех групп мГлу рецепторов в адаптивные механизмы, происходящие в гиппокампе, после индукции нейродегенерации хлоридом триметилолова (ТМТ). Так, результаты анализа экспрессии генов позволили выявить вовлечение рецепторов мГлу4, мГлу3 и мГлу5 в адаптивные механизмы, развивающиеся при нейродегенеративных явлениях, вызванных ТМТ. Показано, что через 3 недели после инъекции ТМТ в гиппокампе животных повышается уровень мРНК для мГлу3, мГлу4 рецепторов и для маркера воспаления COX2, что дало основание впервые выявить конкретные сроки периода нейровоспаления в механизмах действия ТМТ.

Впервые проведено исследование экспрессии генов *GRM4* в гиппокампе и

префронтальной коре после фармакологической активации рецептора мГлу4. Была показана реципрокная зависимость между активностью мГлу4 рецепторов и экспрессией их генов. Полученные результаты дают основание для определения направленности фармакологической коррекции патологических изменений при повреждающих воздействиях.

Для снижения гибели гиппокампальных нейронов, вызванной каинатом, мы впервые применили совместное воздействие на пре- и постсинаптические мГлу рецепторы. Такая фармакологическая модуляция активности мГлу рецепторов позволила остановить/замедлить гибель клеток в гиппокампе. Впервые показано, что при этом возвратился к норме уровень экспрессии генов мГлуР, измененных под влиянием каината.

Научно-практическая значимость работы

Результаты, полученные в работе, позволили выявить среди мГлуР те подтипы, которые в наибольшей степени вовлечены в механизмы нейродегенерации. Это позволяет выбрать мГлу-мишени для нейропротекции и предложить фармакологический способ модуляции их активности на разных этапах нейродегенерации. В условиях ТМТ-интоксикации, на ранних стадиях нейродегенерации необходимо применять лиганды, активирующие мГлу4 рецепторы, затем активировать мГлу3, а на поздних этапах целесообразно ингибировать мГлу5 рецепторы.

Получены результаты, уточняющие способ применения фармакологических агентов, когда известны сдвиги в уровне экспрессии генов в мозге. Выявлена реципрокная зависимость между активностью рецептора и уровнем его мРНК. Такой характер взаимоотношения справедлив, например, для мГлу4 рецепторов: их активация привела к понижению уровня мРНК. Теоретическую значимость имеет выдвинутое нами предположение, что для поддержания компенсаторно-восстановительных механизмов, индуцированных повреждающим фактором, фармакологическое воздействие должно быть направлено на нормализацию уровня экспрессии соответствующего гена.

Терапевтическую ценность может иметь предложенное нами и проверенное на каинатной модели совместное применение лигандов к пре- и постсинаптическим рецепторам. Такой подход к снижению гибели нейронов может иметь преимущества в отношении доз и длительности применения фармакологических агентов.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в рамках современного представления о возможности моделирования патологических состояний мозга человека на животных. Создание экспериментальных моделей нейродегенерации на животных осуществлялось с помощью введения им токсинов. Такие модели не воспроизводят полностью нейродегенеративные болезни, тем не менее, они позволяют исследовать

фундаментальные механизмы, лежащие в основе патологий.

Положения, выносимые на защиту

1) Однократное воздействие каината или триметиллола на мозг крыс вызывает нейродегенеративные процессы в гиппокампе, и воспроизводят такие признаки нейродегенеративных заболеваний у человека, как прогрессивная гибель нейронов и когнитивные дефекты.

2) По мере развития нейродегенерации в гиппокампе, вызванной токсинами, изменяется уровень мРНК отдельных подтипов мГлу рецепторов: мГлу5, мГлу2, мГлу3, мГлу4. Эти изменения направлены на ограничение повреждающего действия глутамата.

3) Между активностью метаботропных рецепторов глутамата и уровнем экспрессии их генов существует реципрокная зависимость. Такая зависимость справедлива для мГлу4 рецепторов, фармакологическая активация которых привела к снижению уровня экспрессии их генов.

4) Активация пресинаптических мГлу2 рецепторов вместе с ингибированием постсинаптических мГлу5 рецепторов уменьшает гибель нейронов в гиппокампе, вызванную каинатом. При этом происходит возвращение уровня экспрессии генов этих рецепторов в гиппокампе к контрольному уровню.

Степень достоверности результатов подтверждается достаточным количеством экспериментальных животных, большим числом наблюдений. Интерпретация полученных результатов проведена с использованием современных методов статистического анализа. Выводы, сформулированные в диссертации, подкреплены фактическими данными, представленными в рисунках и таблицах.

Апробация диссертации

Результаты работы были представлены в качестве докладов или стендовых сообщений на Всероссийской конференции с международным участием: «Нейроинформатика» (Москва, 2014); Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология наука XXI века» (Пущино, 2014, 2015, 2016); Всероссийской конференции с международным участием «Инновации в фармакологии: от теории к практике» (Санкт-Петербург, 2014); Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пущино, 2014, 2015); Всероссийской конференции с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пущино, 2015); XII международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2016); V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2016); Всероссийской конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пущино 2016, 2017); XXIII съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017);

Зимней школе по молекулярной биологии и биофизике (Гатчина, 2018).

Публикации

По результатам работы опубликовано 8 статей в научных журналах из них 6 рекомендуемых ВАК и 14 публикаций в материалах конференций.

Структура и объем диссертации.

Диссертация содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и цитированную литературу. Работа изложена на 116 страницах, содержит 38 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 249 ссылок.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы изложены основные современные сведения о глутамате, его рецепторах и их участия в механизмах нейродегенерации. Описаны токсические модели нейродегенерации используемые в работе. Приведена информация о применении лигандов к мГлу рецепторам при различных неврологических расстройствах ЦНС.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на самцах крыс линии Вистар в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных, и соблюдением норм биоэтики и комиссии по биоэтике и биологической безопасности ИТЭБ РАН. Животных содержали в стандартных условиях по 2-3 крысы в клетке.

2.1 Фармакологические воздействия

Введение каината. Наркотизированным пентобарбиталом (30 мг/кг, в/б) животным вводили каиновую кислоту (Sigma) в дорсальный гиппокамп билатерально (AP: -3.0; L: 3.0, H: 3,0) в дозе 0,2 мкг в каждую сторону. У крыс после микроинъекции каиновой кислоты наблюдали лимбические судороги, которые продолжались менее трех часов и не наблюдались после (животные с проявлением судорожной активности для поведенческих экспериментов не использовались).

Введение TMT. После предварительного привыкания к рукам крысам делали однократную инъекцию TMT (Sigma) в дозе 7,5 мг/кг, подкожно. Вещество растворяли в изотоническом растворе NaCl и вводили в объеме 0,5 мл. Через 48 часов после инъекции TMT животным вводили нембутал 20 мг/кг, внутривентрально, чтобы предотвратить судорожную активность.

Модуляторы рецепторов мГлу рецепторов. В работе использовали: позитивный аллостерический модулятор мГлу4 TCN 238 ((E)-4-(2-Phenylethenyl)-2-pyrimidinamine, Tocris); неконкурентный антагонист мГлу5 рецепторов MPEP (2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine, Tocris); позитивный аллостерический модулятор мГлу2 рецепторов LY354740 (1S,2S,5R,6S)-2-aminobicyclo [3.1.0] hexane-2,6-

dicarboxylic acid), синоним eglumegad, Tocris). Вещества растворяли и использовали согласно рекомендации производителя.

2.2 Поведенческие тесты.

Для исследования когнитивных функций у крыс после нейродегенеративных изменений в гиппокампе животных применяли поведенческие тесты. Животных обучали пищедобывательной реакции в экспериментальной камере (Рис. 1А) или навыку чередования в лабиринте с четырьмя отсеками (Рис. 1Б), или реакции пассивного избегания в аппаратно-программном комплексе «Шелтер» («Нейроботикс», Москва) (Рис. 1В).

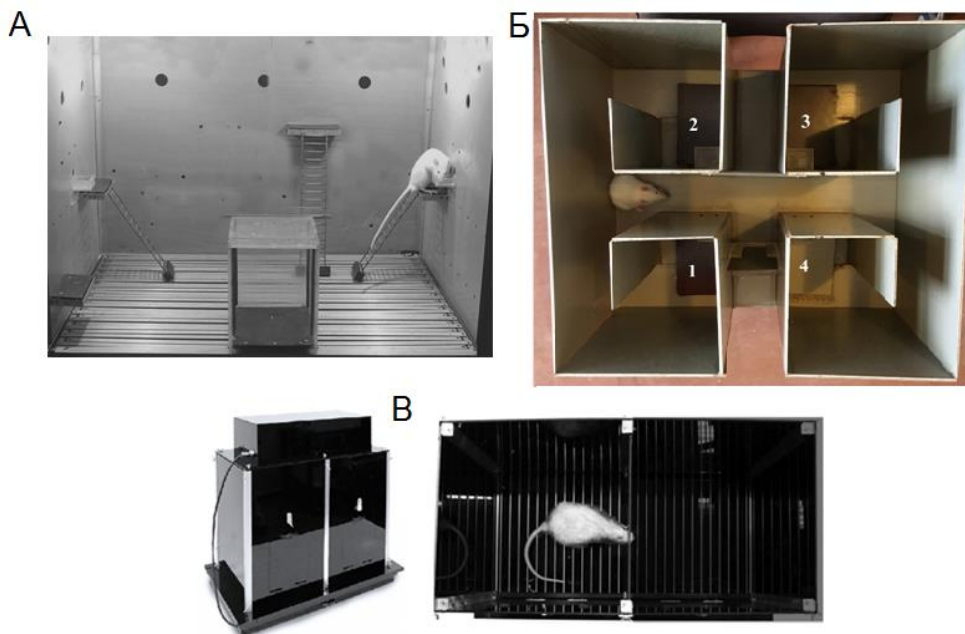


Рис. 1. Установки для поведенческих тестов. А - экспериментальная камера; Б – лабиринт; цифрами указаны номера полок для пищевого подкрепления; В - комплекс «Шелтер».

2.3 Морфологические исследования.

Световая и флуоресцентная микроскопия на каинатной модели нейродегенерации проводилась совместно с д.б.н. Гордон Р.Я.- в.н.с. Лаборатории микроспектрального анализа клетки и клеточных систем ИБК РАН - обособленного структурного подразделения ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований». Животных декапитировали, мозг извлекали и фиксировали в смеси Карнуа (этанол - хлороформ - уксусная кислота 6:3:1 соответственно), заключали в парафин. Из блоков готовили срезы толщиной 10 мкм. Состояние пирамидных нейронов гиппокампа выявляли окрашиванием срезов мозга крезильным фиолетовым (*Fluka, USA*) (по Нисслю). Гистологические препараты анализировали с помощью оптического микроскопа *Axiolmager M1 (Carl Zeiss, Germany)*. Длину поврежденного участка полей гиппокампа оценивали на фотографиях срезов с помощью программы *ImageJ*. Признаки нейрональной дегенерации выявляли флуоресцентным красителем *Fluoro-Jade B* по методу (Schmued and Hopkins, 2000).

Состояние нейронов на срезах оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (*Leica*).

Эксперименты на ТМТ-модели нейродегенерации проводились совместно с к.б.н, с.н.с. Лаборатории экспериментальной нейробиологии ИТЭБ РАН Михеевой И.Б. Через 1, 3 и 6 недель после инъекции ТМТ из мозга крыс выделяли гиппокамп, погружали на два часа в раствор для фиксации (2,5% раствор глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере) и переносили на два часа в раствор для дофиксации (2% раствор четырехокси осмия). Затем обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации 50, 70, 80, 90 и 100 % (по 10 мин) и в 100 % ацетоне (3 смены по 10 мин). Обезвоженные образцы пропитывали смесью ацетон-эпон в пропорции 3:1 на первые сутки и 1:3 на вторые сутки; далее заключали образцы в эпон-812. Затем производили полимеризацию при 37°C одни сутки и переносили образцы на 60°C на 24 часа. Из полученных эпоновых блоков готовили серию фронтальных срезов с помощью пирамита LKB.

2.4. Анализ экспрессии генов.

Уровень экспрессии генов определяли с помощью ПЦР в реальном времени с реакцией обратной транскрипции.

Праймеры подбирали на основе баз данных NCBI GenBank с использованием базы данных Blast. В качестве референсных использовали гены *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) и бета-актина (Табл.1).

Таблица 1. Перечень используемых в работе праймеров.

| Ген (кодируемый белок) | Forward 5'→3' | Reverse 5'→3' |
|---|------------------------------|------------------------|
| <i>GAPDH</i> (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) | ACAGCAACAGGGTGGTGGAC | TTTGAGGGTGCAGCGAACTT |
| <i>Actb</i> (бета-актин) | ATGGTGGGTATGGGTCAGAA | CTTTTCACGGTTGGCCTTAG |
| <i>Grm2</i> (мГлу2) | STATGCCACCCACAGTGATG | CACAGTGCGAGCAAAGTAATC |
| <i>Grm3</i> (мГлу3) | AGGAGTGAAGCTGGGTGTTC | CACCAATGACTCCTGCAATG |
| <i>Grm4</i> (мГлу4) | AAGGTGCAGTTCGTGATTGA | TGAGAAGTTGACGTTCTCTGA |
| <i>Grm5</i> (мГлу5) | GTTCGTGAGCAATATGGGATT | GATCCATCTACACAGCGTACCA |
| <i>Grm7</i> (мГлу7) | CAGATCGCAAATGCACAGGAC | GGGTTCCAGCACTACCATTGAA |
| <i>GABRA1</i> (альфа-1 субъединица ГАМКА рецептора) | CCGTGTCAGACCACGATATG | TACAGCAGTGTGCCATCCTC |
| <i>COX2</i> (Циклооксигеназа-2) | GCTTTCTCCAACSTCTCCTACT AC | CATGGGAGTTGGGCAGTCA |
| <i>Snn</i> (станнин) | AAGAAGCCCCTCCAAGCACT | CATGGCCCCTTGGCAGAATA |

Выделение тотальной РНК из мозга крыс. Животных декапитировали, головной мозг помещали в холодный физиологический раствор (4°C), выделяли гиппокамп и префронтальную кору. Гомогенизацию структур проводили сразу

после их выделения в гомогенизаторе стекло-тефлон, используя соотношение 100мг ткани на 3 мл денатурирующего буфера Lysis buffer (RLT), входящего в набор для выделения РНК (QIAGEN RNeasy Mini Kit). Тотальную РНК выделяли согласно протоколу, прилагаемого к данному киту. Концентрацию тотальной РНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop spectrophotometer 1000. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой, качество оценивали электрофорезом в 1% агарозном геле.

Синтез первой цепи кДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили по стандартному протоколу, приложенному к набору реактивов для обратной транскрипции («Fermentas», Литва). Все реакции проводили в объеме 25 мкл.

Количественная ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе «ДТ-лайт» (ДНК-Технология, Россия). ПЦР-смесь содержала матрицу (кДНК, полученную реакцией обратной транскрипции), готовую смесь для ПЦР в реальном времени *qPCRmix-HS SYBR* (Евроген), праймеры по 4пМ и стерильную воду свободную от РНКаз. Объем реакционной смеси был равен 20 мкл. После завершения амплификации во всех случаях качество и молекулярный вес ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически в 3% агарозном геле. Все эксперименты с ОТ-ПЦР проводились как минимум в трех повторях. Расчёт относительного количества синтезированных ампликонов проводили по методу, предложенному (Schmittgen, Livak, 2008).

Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез проводили при токе 40 мА (напряжение 60 – 120 В) в течение 20-30 минут. Специфику продуктов ОТ-ПЦР оценивали по продукту и его молекулярной массе с помощью маркера MassRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific).

2.5. Статистическая обработка результатов.

Для оценки достоверности различий между экспериментальными группами крыс использовали критерий Манна-Уитни, а также однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением, тест Даннета (Prizm 5.0 для Windows). Различия между группами считали статистически значимыми при $P < 0.05$. Информация о статистических параметрах для каждого эксперимента приведена в подписях к рисункам.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Каинатная модель нейродегенерации в гиппокампе.

Влияние каината на морфологию гиппокампа. Структура гиппокампа подопытной группы после микроинъекции каината имела явно выраженные дегенеративные явления в левой и правой сторонах дорзального гиппокампа. Через 2 недели после микроинъекции каината произошла деградация слоев пирамидных клеток в полях СА3 и СА4 гиппокампа в результате лизиса нейронов на протяженности $0,7 \pm 0,2$ мм (Рис. 2 А). Нейроны, которые граничили с местами

повреждений, имели набухание цитоплазмы, ее вакуолизацию, потерю целостности мембраны, что, как правило, является морфологическими признаками некроза (Kroemer *et al.*, 2009). Практически интактными оставались пирамидные нейроны поля CA1 (Рис. 2 А). Через 4 недели (Рис. 2Г) было детектировано усиление повреждений нейронов в полях CA3 и CA4, ($1,2 \pm 0,24$ мм); наблюдалась частичная потеря слоя пирамидных нейронов в поле CA1 ($0,77 \pm 0,36$ мм). У большинства оставшихся нейронов отмечены признаки некроза.

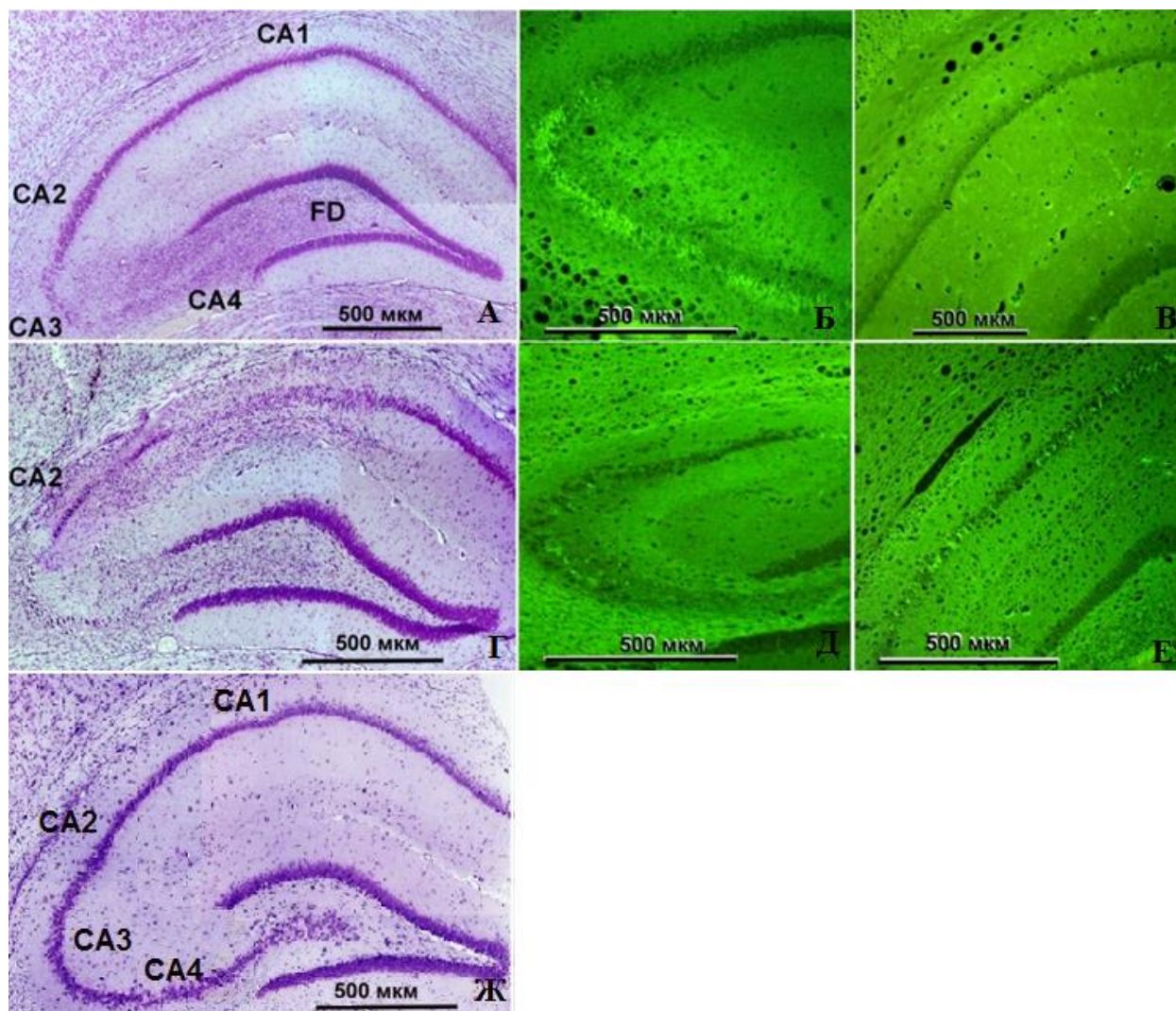


Рис. 2. Срезы гиппокампа после введения каината (0,2 мкг) через 2 недели (А-В) и 4 недели (Г-Е), физиологического раствора (Ж). Окрашивание срезов крезильным фиолетовым (по Нисслю) (А, Г, Ж); fluoro-jade В (Б, В, Д, Е)
 А – деградация слоев пирамидных нейронов в полях CA3 и CA4; нейроны в CA1 и CA2 остаются практически интактными; Б – флуоресценция поврежденных нейронов в CA3 и CA4; В – отсутствие флуоресценции в поле CA1; Г – потеря нейронов в CA3 и CA4, значительная потеря нейронов в поле CA1, частичное повреждение нейронов поля CA2; Д – мечение поврежденных нейронов полей CA3 и CA4; Е – мечение поврежденных нейронов поля CA1; Ж – контрольный срез гиппокампа.

Результаты экспериментов с применением Fluoro-Jade B, который позволяет выявить необратимые нейродегенеративные изменения, показали, что через 2 недели после внутригиппокампального введения КК происходило позитивное мечение в полях СА3 и СА4 гиппокампа (Рис.2 Б, В). Причем, помимо свечения в пирамидных нейронах, флуоресцентная метка наблюдалась также и в прилежащих к ним областям среза. Вероятнее всего, объектом такого свечения являлась реактивная астроглия, поскольку Fluoro-Jade B, помимо дегенерирующих нейронов способен окрашивать реактивную микроглию и астроглию в процессе нейрональной дегенерации (Damjanac *et al.*, 2007). Через 4 недели после микроинъекции каината при сохранившемся позитивном мечении полей СА3 и СА4 было отмечено появление флуоресценции в поле СА1 (Рис.2 Д, Г).

Следствием дефектов структуры гиппокампа после действия каиновой кислоты стало нарушение когнитивных функций у животных.

Влияние каината на когнитивные функции животных. Воспроизведение предварительно выработанного навыка у крыс изучали через 3 или 6 дней после введения каината. Во время теста воспроизведения навыка, как и при обучении, пищевое подкрепление помещали на целевую полку, затем животных помещали в стартовый отсек, дверцу открывали и регистрировали время достижения целевой полки. При этом, как и в процессе обучения, дневная серия состояла из 10 побегов, и тест проводили в течение 5 дней. Подгруппа контрольных животных воспроизводила навык без затруднений, и только первая попытка у части крыс превышала 10 с. Все остальные побежки совершались со временем менее 5 с. У крыс в обеих подопытных группах воспроизведение пищедобывательного навыка, выработанного до повреждения гиппокампа, оказалось нарушенным. Животные затрачивали больше времени для достижения целевой полки. При ежедневном повторении теста было показано, что такое нарушение устойчиво продолжается в течение нескольких дней, несмотря на упрочение навыка (Рис. 3).

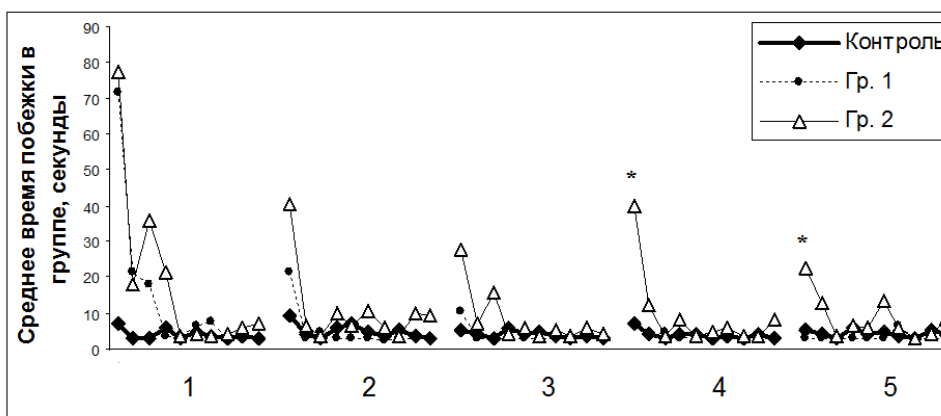


Рис. 3. Воспроизведение пищедобывательного навыка, выработанного до повреждения гиппокампа каиновой кислотой. По оси абсцисс – дни теста. Гр. 1 (n=10) – воспроизведение через 3 дня после микроинъекции КК; Гр. 2 (n=10) – воспроизведение через 6 дней после микроинъекции КК. *- $P < 0,01$ (критерий Манна-Уитни).

Это означает, что если тест на сохранение/воспроизведение навыка начинался через 3 дня (Гр.1) после микроинъекции каиновой кислоты в гиппокамп, его восстановление происходит быстрее, чем у животных (Гр. 2) через 6 дней после микроинъекции. То есть, полученные результаты показали зависимость степени нарушения поведения крыс от времени, прошедшего после повреждения гиппокампа.

Таким образом, степень нарушения предварительно выработанного навыка меньше, а восстановление его происходит быстрее, если поведенческие эксперименты начинали через 3, а не через 6 дней после микроинъекции КК. Основной причиной такой динамики когнитивных нарушений у животных, является нейродегенеративный процесс, развивающийся во времени и затрагивающий все новые клеточные элементы.

Учитывая тот факт, что основным механизмом гибели нейронов в гиппокампе при действии каиновой кислоты является эксайтотоксичность, а подходы к ее снижению через прямое влияние на ионотропные рецепторы глутамата, активацию транспортеров глутамата, осуществляющих обратный захват нейромедиатора, блокаду поступления ионов кальция оказались недостаточно неэффективными и/или обладали нежелательными побочными эффектами при клинических испытаниях, наше внимание привлекли мГлу-рецепторы.

3.2 Фармакологическая модуляция активности мГлуР после микроинъекции каината.

Для проведения фармакологической модуляции активности мГлу рецепторов была исследована динамика экспрессии этих рецепторов в гиппокампе и фронтальной области неокортекса через 1 и 4 недели после микроинъекции каиновой кислоты в гиппокамп. Полученные результаты показали, что уровень экспрессии мГлу_{2/3} рецепторов в гиппокампе повышен через 1 неделю, в то же время для мГлу₅ рецепторов тенденция противоположна: их экспрессия была снижена в этот период (Таб.2).

Таблица 2. Среднее количество ампликонов относительно контрольных животных \pm SEM. Уровни экспрессии генов мГлуР в гиппокампе и префронтальной коре крыс после инъекции КК были нормализованы по контрольной группе и мРНК GAPDH. (критерий Манна – Уитни). *-P<0.05

| мРНК рецептора | гиппокамп | | Префронтальная кора | |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 1 неделя после кк (n=5) | 4 недели после кк (n=5) | 1 неделя после кк (n=5) | 4 недели после кк (n=5) |
| мГлу ₂ | 5,5 \pm 2,0* | 1 \pm 0,2 | 1,8 \pm 0,5* | 1,7 \pm 0,7 |
| мГлу ₃ | 2,1 \pm 0,8* | 1, \pm 50,4 | 1 \pm 0,2 | 1,3 \pm 0,2 |
| мГлу ₅ | 1,1 \pm 0,1 | 2,0 \pm 0,8* | 0,54 \pm 0,16* | 1 \pm 0,1 |

Через 4 недели уровень экспрессии мГлу2/3 рецепторов нормализовался, а для мГлу5 рецепторов к этому времени превышал контрольный уровень. Это означает, что для адаптивной компенсации функций мозга активность мГлу5 рецепторов не следует ингибировать в течение длительного срока и поэтому мГлу5 рецепторы ингибировали антагонистом кратковременно (в течение 2-х дней), а мГлу2/3 рецепторы активировали более длительно (в течение 5 дней). Внутрибрюшинное введение МРЕР и LY354740 начинали через 5 дней после микроинъекции каината животным. Такое воздействие не предполагало полной сохранности клеточных элементов гиппокампа, так как к этому времени значительное число нейронов в СА3 уже погибло. Основной задачей мы считали прекращение развития нейродегенеративных явлений в гиппокампе.

Повреждение гиппокампа было значительным через 2 недели после микроинъекции каината и, как уже указывалось, со временем нейродегенеративные явления усиливались. Однако, совместное применение антагониста мГлу5 рецепторов и агониста мГлу2 рецепторов способствовало сохранению основной массы нейронов поля СА1 в интактном состоянии (Рис.4 В, Д). Гибель нейронов была отмечена в поле СА3, но не в поле СА1, что было выявлено с помощью Fluoro JadeB.

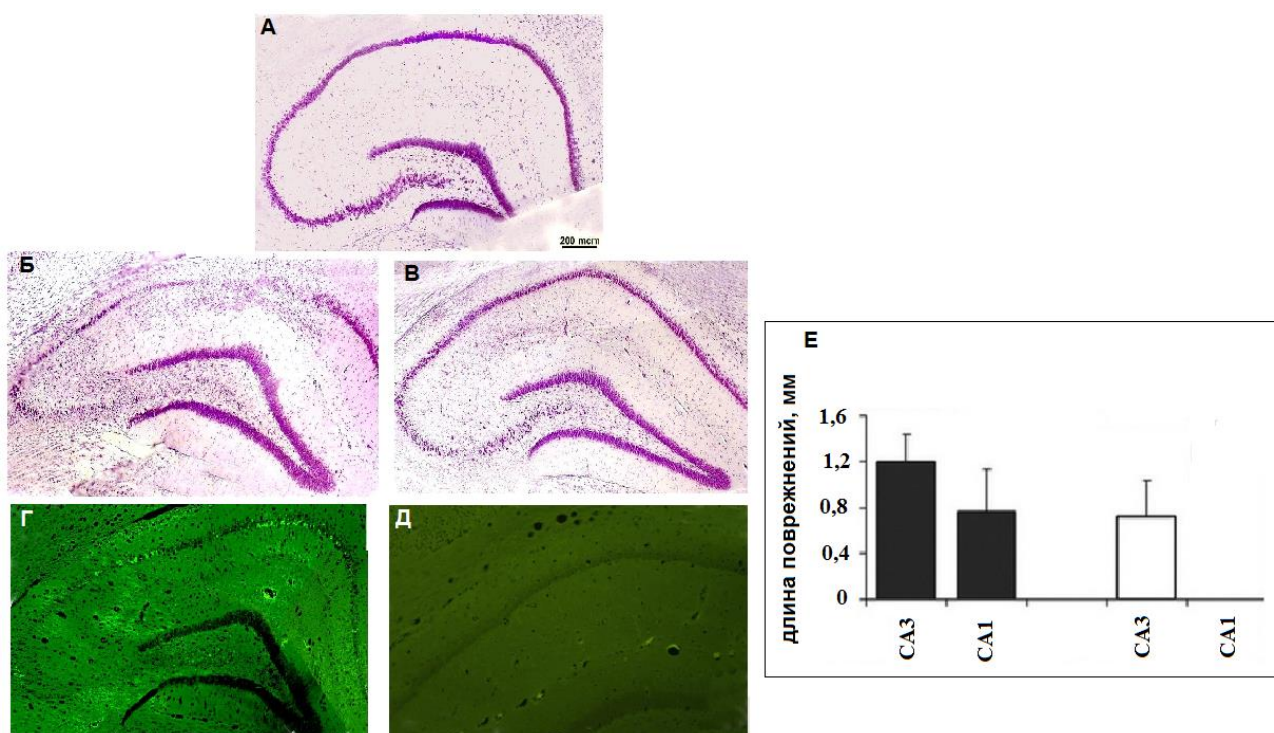


Рис.4. Срезы гиппокампа после микроинъекции каината и последующей фармакологической модуляции мГлуР. А - срез гиппокампа контрольной крысы; Б и Г - срез гиппокампа через 4 недели после внутригиппокампальной микроинъекции каината 0,2 мкг; В и Д - срез гиппокампа через 4 недели после микроинъекции каината с последующим введением МРЕР и LY354740.

Е – повреждения СА1 и СА3 полей гиппокампа крыс через 4 недели после каината (черные столбики) и после каината с последующим введением МРЕР и LY354740 (белые столбики).

Влияние каината и последующей фармакологической модуляции мГлуR на экспрессию генов. Полученные гистологические результаты в экспериментах с введением КК и дальнейшей фармакотерапией дали возможность корректировать сроки введения лигандов к мГлу рецепторам: МРЕР вводили в дозе 5 мг/кг через 24 и 48 часов после каината, а LY354740 в дозе 2 мг/кг через 48 часов и три последующих дня.

Уровень экспрессии гена постсинаптических рецепторов мГлу5 под влиянием каината в гиппокампе увеличился (Рис. 5). Активация экспрессии этого рецептора может означать усиление глутаматергической передачи, реализующей эксайтотоксичность. Отметим, что в префронтальной коре, где клеточная гибель под влиянием каината не наблюдалась, уровень экспрессии гена мГлу5 не изменился. Однако, в этой области мозга значительно активировалась экспрессия гена альфа1-субъединицы ГАМК_A рецепторов, что можно интерпретировать как усиление тормозного влияния, необходимого для компенсации гипервозбудимости гиппокампа. Что касается мГлу2 рецепторов, уровень экспрессии их генов под влиянием каината не изменился ни в гиппокампе, ни в префронтальной коре.

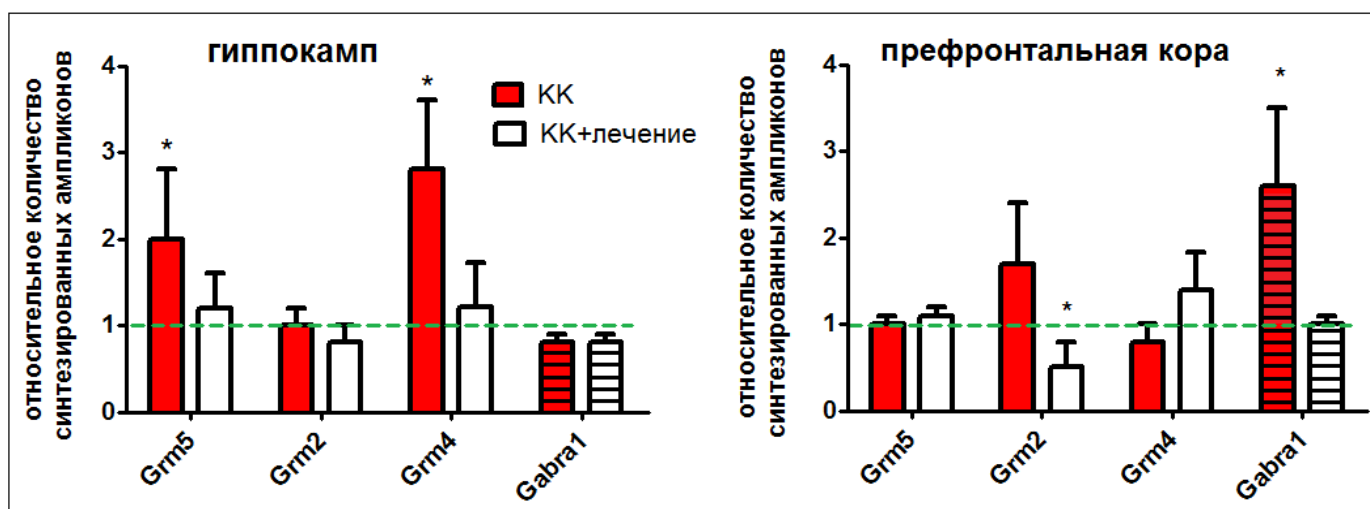


Рис. 5. Экспрессия генов относительно контрольных животных (n=5) через 4 недели после микроинъекции каината в гиппокамп (n = 10) и последующего введения антагониста мГлу5 рецепторов МРЕР и агониста мГлу2 рецепторов eglumegad (n=10). Указано М±SEM; * - P<0,05 относительно контрольных животных по критерию Манна-Уитни.

Фармакологическая модуляция активности мГлу рецепторов, предпринятая нами для ослабления повреждения гиппокампа, не только уменьшила гибель нейронов в гиппокампе, но и повлияла на содержание мРНК рецепторов, приблизив уровень экспрессии мГлуR к контрольному уровню.

3.3 ТМТ-модель нейродегенерации.

Использование ТМТ в качестве инструмента для запуска нейродегенерации дает несколько преимуществ: известны повреждаемые области мозга, клеточные

мишени и динамика нейродегенерации; повреждение и гибель нейронов происходит на протяжении нескольких дней, что позволяет детально исследовать динамику нейродегенеративного процесса.

Влияние ТМТ-интоксикации на поведение животных. После инъекции ТМТ мы наблюдали снижение массы тела у животных первые 2 дня. В течение одной недели масса животных подопытной группы не увеличивалась, а затем стала повышаться и через 3 недели, после инъекции крысы контрольной и опытной групп по этому показателю достоверно не различались.

Влияние ТМТ на реакцию чередования в лабиринте. Поведенческие тесты в лабиринте с четырьмя отсеками начинали через одну неделю после инъекции нейротоксиканта. Стабильное воспроизведение навыка наблюдали у животных после 4-5 дней тренировки. Динамика обучения в контрольной и подопытной группах была сходной, и время побегов достоверно не различалось между группами. Инъекция ТМТ не оказала существенного влияния, как на двигательную активность животных, так и на способность к выработке реакции чередования. Однако, изменение режима подкрепления (смена подкрепляемой полки) позволило выявить дефекты в поведении крыс после ТМТ. У них существенно ухудшилась способность адекватно реагировать на изменившуюся экспериментальную ситуацию. Крысы продолжали совершать побежки к уже не подкреплявшейся целевой полке. Причем число таких реакций, которые рассматривались как ошибочные, было больше у животных в подопытной группе по сравнению с контрольной (Рис. 6).

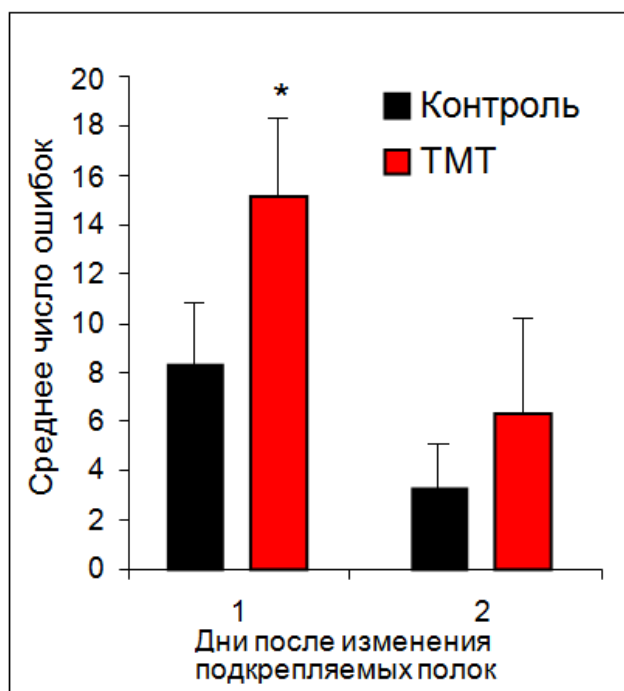


Рис. 6. Среднее число ошибочных побегов к неподкрепляемой полке, совершаемых крысами через 2 недели после инъекции ТМТ. Указано значение $M \pm SEM$;

* - $P < 0,02$, по критерию Манна-Уитни.

Настойчивое повторение заученной реакции, потерявшей биологическое значение, характерно для животных с поврежденным гиппокампом (Arkhipov *et al.*, 2008).

Влияние ТМТ на реакцию пассивного избегания. Тест на пассивное избегание проводили через 2–3 недели после введения ТМТ. До фазы обучения все животные заходили в темный отсек через 3–5 с (Рис. 7), где они получили электрокожное раздражение. Через 1 неделю после обучения проверяли память животных об электрораздражении. Большинство животных контрольной группы, когда их помещали в светлый отсек, не двигались в течение 3 мин, демонстрируя реакцию замирания. Это означает, что животные в контрольной группе помнили об электрораздражении в темном отсеке и избегали заходить в него. Напротив, у животных подопытной группы память оказалась нарушенной, и они входили в темный отсек через 26 ± 24 с (рис. 7).

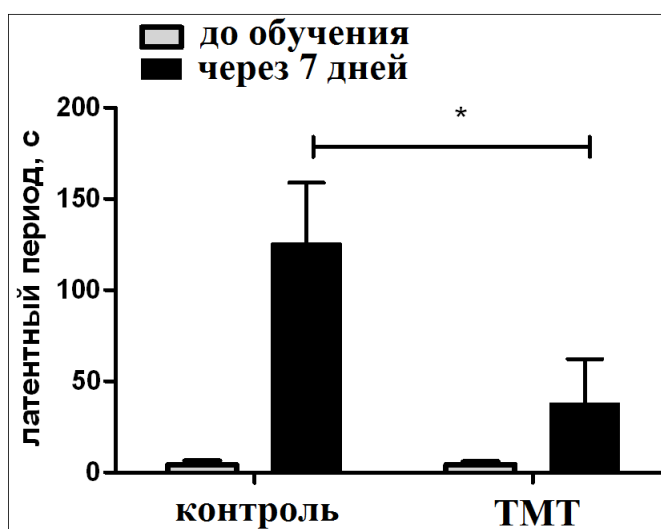


Рис.7. Тест пассивного избегания в контрольной группе ($n = 7$) и группе с введением ТМТ ($n = 7$). Латентный период вхождения животных в темный отсек до обучения и через 7 дней после обучения. Данные представлены как $M \pm SEM$. * - $P = 0,004$ (по сравнению с контрольной группой, критерий Манна-Уитни).

Влияние ТМТ на морфологию гиппокампа. Гистологические исследования показали, что ТМТ вызвал структурные изменения гиппокампа, особенно выраженные в полях СА4 и СА3 гиппокампа (Рис. 8). На срезах гиппокампа контрольных животных большинство нейронов поля СА3 имели светлую цитоплазму, и содержали светлые округлые или слегка овальные ядра, в которых наблюдали относительно небольшое количество гетерохроматина. У крыс, подвергшихся действию ТМТ, количество нейронов в полях СА3-СА4 гиппокампа заметно снизилось. Нейроны имели дегенеративных изменений: наличие признаков набухания, клеточная мембрана имела нечеткий контур. Среди светлых нейронов были видны гиперхромные клетки, апикальные дендриты плохо различимы. У оставшихся нейронов ядро не изменилось, однако форма нейронов отличалась:

детектированы изменения структуры перикарионов и их отростков.

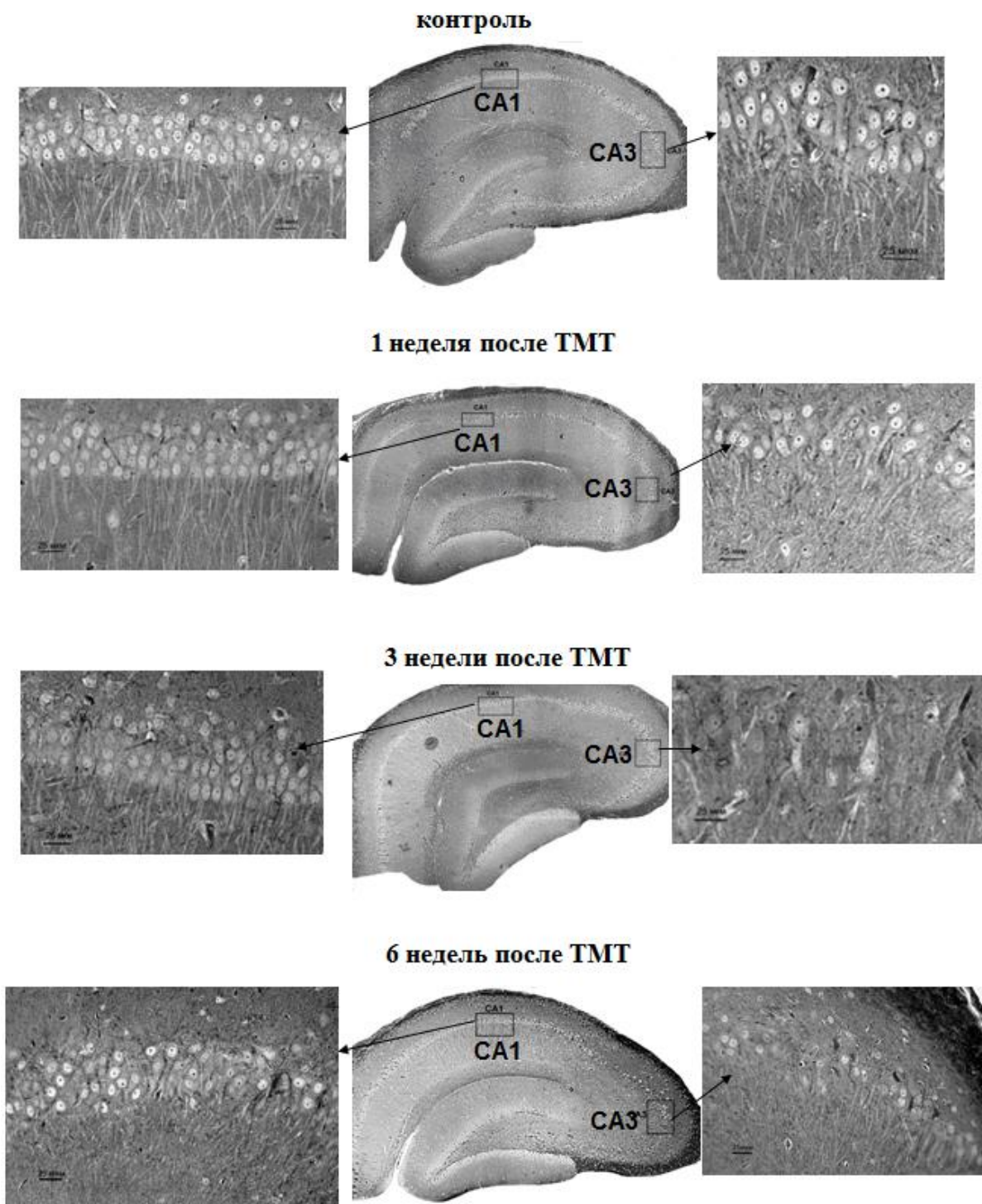


Рис. 8. Морфологические повреждения гиппокампа крыс после инъекции ТМТ.

При подсчете удельного количества клеток в полях гиппокампа СА3 и СА4 через 1 неделю после ТМТ было выявлено снижение их количества после воздействия ТМТ примерно на 25% по сравнению с контрольными животными (14.4 ± 2.3 и 19.3 ± 2.7 на 10000 мкм^2 ; $P < 0.05$). Эти изменения подтверждают нейротоксические свойства ТМТ, избирательно затрагивающие гиппокампальные пирамидные нейроны.

Влияние ТМТ на экспрессию генов. В работе определяли содержание мРНК в целом гиппокампе, а не в его отдельных частях, так как интегральный показатель уровня экспрессии генов может служить основой для разработки фармакологических подходов, направленных на улучшение состояния гиппокампа в целом.

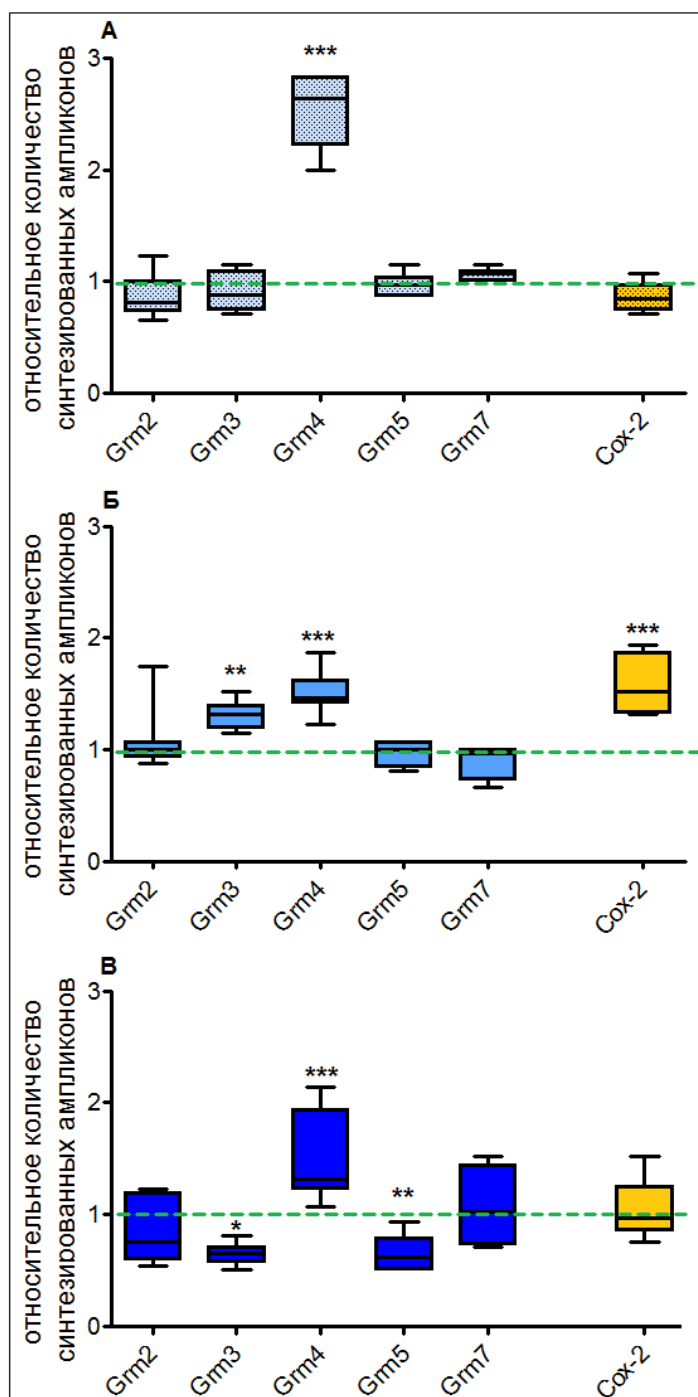


Рис. 9. Относительный уровень экспрессии генов мГлу рецепторов и СОХ-2 в гиппокампе крыс (n = 38) через одну (А), три недели (Б) и шесть недель (В) после инъекции ТМТ (уровень экспрессии в гиппокампе контрольных животных принят за единицу). Число ампликонов отображено в виде диаграммы, границами которой служат первый и третий квартили, линия внутри бокса – медиана, концы вертикальных отрезков – крайние значения статистически значимой выборки. *- P<0,05; **.- P<0,01; ***.- P<0,0001 (однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением, тест Даннета).

Уровень экспрессии генов мГлуР в гиппокампе через одну неделю после инъекции ТМТ существенно изменился для гена, кодирующего мГлу4 рецепторы. Экспрессия других пресинаптических рецепторов мГлу2, мГлу3, мГлу7, а также постсинаптических мГлу5 рецепторов не изменилась. (Рис. 9 А).

Рецепторы мГлу4 локализованы на пресинаптических терминалях в активной зоне и опосредуют свое действие через Gi/o белок; их активация ингибирует высвобождение глутамата (Moyanova *et al.*, 2011; Nicoletti *et al.*, 2011). Повышенный уровень мРНК для мГлу4 позволяет предположить, что этот подтип мГлуР активно вовлечен в механизмы компенсации повреждений, вызванных избытком глутамата.

Через три недели после инъекции ТМТ экспрессия мГлу4 оставалась повышенной, и кроме того, повышалась экспрессия мГлу3 (Рис. 9 Б). В этот период ТМТ-интоксикации был также повышен уровень экспрессии гена циклооксигеназы-2 (СОХ-2), что свидетельствует о развитии процесса нейровоспаления.

Через шесть недель после ТМТ было выявлено достоверное снижение экспрессии генов мГлу3 и мГлу5, в то время как мГлу4 оставался повышенным (Рис.9 В). Отметим, что в этот период уровень мРНК СОХ-2 нормализовался, что, вероятно, свидетельствует о завершении стадии воспаления.

В целом, исследование экспрессии отдельных подтипов мГлуР показало их существенно различную роль в механизмах повреждения/восстановления гиппокампа после ТМТ-интоксикации. В течение всего периода исследования уровень экспрессии генов мГлу2 и мГлу7 рецепторов у подопытных животных не отличался от контрольного уровня, в отличие от мГлу4, уровень экспрессии которого был значительно повышен во всех временных точках. Особый интерес, по нашему мнению, представляют результаты экспрессии мГлуР через 6 недель после ТМТ-интоксикации. Измененный уровень экспрессии отдельной подгруппы мГлуР в столь отдаленный период свидетельствует об их вовлечении в механизмы адаптивных перестроек, направленных на компенсацию повреждения. Такой характер изменений, по-видимому, проявляют мГлу5 рецепторы, которые преимущественно локализованы на постсинаптических мембранах и сопряжены с НМДА-рецепторами. Снижение их уровня экспрессии уменьшает вероятность эксайтотоксического повреждения нейронов. Пониженным оказался и уровень мГлу3 рецепторов, роль которых многообразна, так как они локализованы не только на пресинаптических окончаниях, но и на глиальных клетках. Кроме того, показано их участие в регуляции содержания экстрасинаптического глутамата (Baker *et al.*, 2006).

Таким образом, динамика экспрессии мГлу рецепторов позволила выявить, что мГлу4, мГлу3 и мГлу5 рецепторы вовлечены в адаптивные механизмы, развивающиеся при нейродегенеративных явлениях, вызванных ТМТ, и они могут быть перспективными мишенями для снижения гибели нейронов.

3.4. Соотношение между фармакологической модуляцией активности рецепторов и экспрессией генов.

В последние годы создано большое число селективных лигандов к мГлу рецепторам, с ними активно проводятся экспериментальные работы с моделированием ряда неврологических заболеваний на животных. Некоторые такие агенты проходят доклинические и клинические испытания. Экспрессия генов глутаматных рецепторов находится под контролем функциональной активности этих рецепторов, однако многообразие способов регуляции транскрипции не позволяет определить конкретных участников цепочки прямой и обратной связи. Тем не менее, отсроченные изменения в уровне экспрессии отдельных подтипов мГлу-рецепторов указывают на их участие в адаптивных изменениях в качестве ответа на повреждение нейронов.

Чтобы выявить, как фармакологическая модуляция влияет на экспрессию генов, мы проводили эксперименты, в которых исследовали влияние активации рецепторов мГлу4 на экспрессию их генов *Grm4*. Поведенческие эксперименты показали, что 4-х кратное введение позитивного аллостерического модулятора мГлу4 рецепторов TCN 238 не повлияло на воспроизведение пищедобывательного навыка. В работах других авторов, использующих агонисты к мГлу4 рецепторам, также не выявлено влияние этой группы веществ на процессы памяти (Klakotskaia *et al.* 2013). Результаты наших исследований показали, что экспрессия *Grm4* через одни сутки после последней инъекции TCN 238 достоверно не различалась у животных контрольной и опытной групп ни в префронтальной коре, ни в гиппокампе. Однако через пять суток уровень мРНК мГлу4 в гиппокампе оказался сниженным в отличие от префронтальной коры, где экспрессия генов не изменилась (Рис. 10).

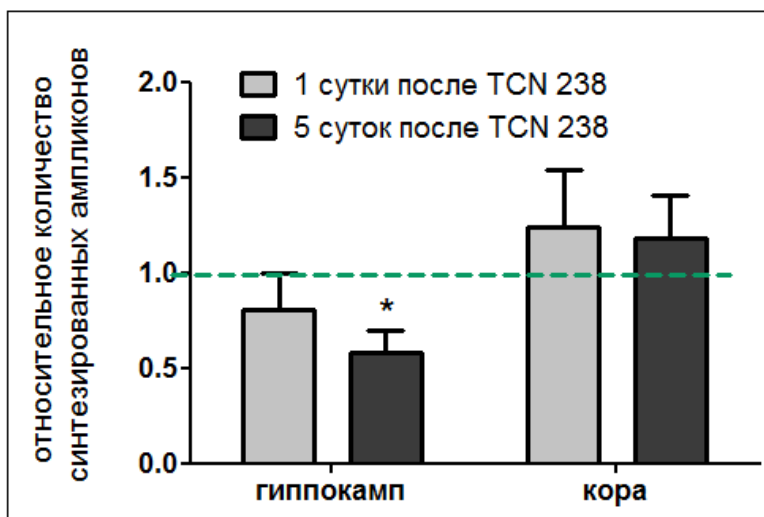


Рис.10. Относительный уровень экспрессии генов мГлу4 рецепторов в мозге крыс (n=12) после 4-х кратного введения позитивного аллостерического модулятора TCN 238 по отношению к контрольным животным (уровень экспрессии контрольных животных принят за единицу). Указано $M \pm SEM$. *- $P < 0,01$ относительно контрольных крыс по критерию Манна-Уитни.

Таким образом, выявлено что, фармакологическая активация мГлу4 рецепторов с помощью TCN 238 крысам не повлияла на воспроизведение предварительно выработанного пищедобывательного навыка, однако при этом произошло отсроченное (через 5 суток) снижение экспрессии их генов в гиппокампе. То есть, для мГлу4 характерна реципрокная зависимость между активностью и экспрессией гена. Недавние исследования указывают на возможное использование селективных аллостерических модуляторов мГлу4-рецепторов для лечения болезни Паркинсона (Amalric *et al.*, 2013; Canella *et al.*, 2015; Gasparini *et al.*, 2013). Наши экспериментальные результаты показали, что мГлу4 рецепторы участвуют в механизмах повреждения гиппокампа, вызванных ТМТ. Через 1, 3 и 6 недель после введения ТМТ уровень экспрессии генов мГлу4 был повышен, что указывает на целесообразность активации этих пресинаптических рецепторов для достижения компенсации повреждений мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные раскрывают роль глутамата в качестве универсального регулятора многих процессов в мозге. Глутамат играет координирующую роль в механизмах развития нейродегенерации, которая не ограничивается индукцией эксайтотоксичности, а участвует в регуляции синаптической пластичности, нейровоспаления и других процессов, связанных с нейродегенерацией и восстановлением поврежденных функций. Отсюда следует, что стратегия, направленная на регенерацию, не сводится к снижению содержания внеклеточного глутамата: необходимо более дифференцированное влияние на рецепторы с учетом многих факторов, связанных с динамикой дегенеративных явлений. Детекция этих явлений в структурах мозга по мере развития нейродегенерации – важнейшая задача, в решении которой может помочь изучение экспрессии ключевых генов.

Метод ОТ-ПЦР является одним из наиболее чувствительных и позволяет оценивать уровень экспрессии генов в мозге, что дает ценную информацию об их участии в нейродегенеративных процессах. Мы предполагаем, что «запрос», направленный в ядро клетки, выполняет адаптивную роль и отражает потребность в увеличении/уменьшении количества рецепторов в гиппокампе для оптимизации своих функций. Несмотря на функциональную специфичность полей гиппокампа, оценка уровня мРНК мГлу рецепторов в целом гиппокампе, а не в отдельных его частях, может обеспечить интегральную информацию для применения системного фармакологического вмешательства с целью поддержания защитных механизмов в мозге. Исследование экспрессии генов мГлуР в гиппокампе после его повреждения каинатом или ТМТ показало, что роль отдельных подтипов этих рецепторов в механизмах повреждения и восстановления отличается и, что они вовлекаются на разных стадиях нейродегенерации.

Характерной особенностью действия ТМТ на мозг является выраженность различных фаз нейротоксического действия. После однократной инъекции вещества у животных в течение нескольких дней развивались агрессия, судорожная активность, наблюдалось снижение массы тела с постепенной нормализацией поведения, что свидетельствует о компенсаторных процессах, развивающихся в мозге. Поэтому уровень экспрессии генов мГлу рецепторов через разны сроки после инъекции ТМТ, который определялся в настоящей работе, может указывает на те механизмы, которые привели к успешной компенсации нейротоксического повреждения. Среди изученных нами рецепторов, уровни экспрессии мГлу2 и мГлу7 не претерпели значительных изменений, из чего можно заключить, что роль этих рецепторов в компенсаторных механизмах оказалась не существенной. Что касается мГлу3, уровень экспрессии этого подтипа был повышен через 3 недели после инъекции ТМТ в период нейровоспаления, но снижен через 6 недель. Уровень экспрессии мГлу4 рецепторов был повышен во всех исследуемых временных точках, что указывает на необходимость увеличения числа этих пресинаптических рецепторов для достижения скомпенсированного состояния. Если этот подтип рецепторов рассматривать в качестве мишени для терапевтического вмешательства, следует применить их агонисты.

Модуляция активности метаботропных рецепторов глутамата открывает новые возможности коррекции процессов в мозге. Поскольку при нейродегенерации в ЦНС вовлекается несколько механизмов, множественные терапевтические подходы, вероятно, будут более эффективными, чем те, которые направлены на одну мишень. Одной из привлекательных терапевтических стратегий лечения прогрессирующей гибели нейронов является воздействие на мГлу рецепторы. Несмотря на то, что нейроны представляют основную цель для протекции, глиальные клетки также являются важным звеном, поскольку они способны усугубить или ослабить явления, приводящие к повреждению нейронов. Как преимуществом, так и недостатком воздействия на мГлуR является то, что они экспрессируются не только на нейронах, но и на микроглии, астроцитах, олигодендроцитах, а также на многих периферических клетках (Pacheco et al., 2006; Fallarino et al., 2010). Это значительно затрудняет предвидение возможного побочного действия. Как мы выяснили, существует реципрокная зависимость между активностью рецепторов и экспрессией их генов, и это свойство позволяет, в некоторой степени, предсказать возможность фармакологической коррекции нейродегенеративных повреждений. Фармакологическая модуляция активности мГлу рецепторов на каинатной модели нейродегенерации, предпринятая нами для ослабления эксайтотоксического повреждения гиппокампа, не только уменьшила гибель нейронов в гиппокампе, но и привела к нормализации уровня мРНК мГлу рецепторов. Таким образом, результаты нашего исследования могут служить примером информативности изучения экспрессии генов при развитии

патологических процессов в мозге. Полученные нами данные указывают на перспективность мГлу рецепторов как мишеней в качестве фармакологических агентов для терапии нейродегенеративных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1) Нейродегенеративные процессы в гиппокампе, которые вызваны однократным воздействием каината или триметиллола на мозг, воспроизводят некоторые признаки нейродегенеративных заболеваний у человека, включающие прогрессивную гибель нейронов и когнитивные дефекты.

2) Выявлены подтипы мГлу рецепторов, уровень экспрессии генов которых изменяется в гиппокампе по мере развития нейродегенерации/нейропротекции. К таким рецепторам относятся представители Группы I - мГлу5; Группы II - мГлу2 и мГлу3; Группы III - мГлу4.

3) Общим для каинатной и ТМТ-модели нейродегенерации является такое устойчивое изменение экспрессии генов пре- и постсинаптических мГлу рецепторов, которое направлено на ограничение действия глутамата.

4) Для мГлуР характерна реципрокная зависимость между активацией рецепторов и уровнем экспрессии их генов. Такая зависимость продемонстрирована для мГлу4 рецепторов, фармакологическая активация которых привела к снижению уровня экспрессии. Эта закономерность дает возможность прогнозировать результаты фармакологического применения лигандов мГлу4 для снижения нейродегенеративных явлений в мозге.

5) Показана эффективность совместного применения лигандов к пре- и постсинаптическим мГлуР на каинатной модели нейродегенерации в отношении гибели нейронов. Активация мГлу2 рецепторов вместе с ингибированием мГлу5 рецепторов уменьшила гибель нейронов в гиппокампе, что сопровождалось приближением экспрессии генов этих рецепторов к контрольному уровню.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Pershina E.V., Mikheeva I.B., Kamaltdinova E.R., Arkhipov V.I., Expression of mGlu receptor genes in the hippocampus after intoxication with trimethyltin // Journal of Molecular Neuroscience. 2019. – Vol. 67. № 2. – P. 258–264.

2. Першина Е.В., Михеева И.Б., Камалтдинова Э.Р., Архипов В.И., Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс после воздействия хлорида триметиллола // Цитология. 2018. – Т. 60. – № 7. – С. 544–548.

3. Першина Е.В., Капралова М.В., Архипов В.И. Влияние фармакологической модуляции активности метаботропных рецепторов глутамата на экспрессию их генов после эксайтотоксического повреждения. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т 162. – № 12. – С. 756–760.

Pershina E.V., Kapralova M.V., Arkhipov V.I., Effect of Pharmacological Modulation

of Activity of Metabotropic Glutamate Receptors on Their Gene Expression after Excitotoxic Damage in Hippocampal Neurons // Bull Exp Biol Med. 2017. Vol. 162. № 6. – P. 784–787.

4. Першина Е.В., Архипов В.И. Когнитивные нарушения у крыс при моделировании нейродегенерации в гиппокампе с помощью нейротоксиканта хлорида триметилолова // Современные проблемы науки и образования. 2016. – № 4.

5. Pershina E.V., Arkhipov V.I. Subacute activation of mGlu4 receptors causes the feedback inhibition of its gene expression in rat brain // Life Sciences. 2016. Vol. 153. – P 50–54.

6. Гордон Р.Я., Шубина Л.В., Капралова М.В., Першина Е.В., Хуцян С.С., Архипов В.И. Особенности нейродегенерации полей гиппокампа после каиновой кислоты у крыс // Цитология. – 2014. – Т 56.– №12. – С. 919–925.

Gordon R.Ya., Shubina L.V., Kapralova M.V., Pershina E.V., Khutsyan S.S., Arkhipov V.I. Peculiarities of neurodegeneration of hippocampus fields after the action of kainic acid in rats // Cell Tiss. Biol. 2015. Vol. 9. – P 141.

7. Arkhipov V., Kapralova M., Pershina E., Gordon R. Delayed treatments with pharmacological modulators of pre- and postsynaptic mGlu receptors rescue the hippocampus from kainate-induced neurodegeneration // Neuroscience Letters. 2014. Vol. 570. – P 5–9.

8. Архипов В.И., Капралова М.В., Першина Е.В. Эксайтотоксичность и экспериментальные подходы к нейропротекции // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5.

Тезисы докладов:

1. Архипов В.И., Капралова М.В., Гордон Р.Я., Першина Е.В. Когнитивные функции при нейродегенерации, вызванной эксайтотоксином. Сборник научных трудов, часть 2, XVI Всероссийская научно-техническая конференция с международным участием "НЕЙРОИНФОРМАТИКА-2014" (Москва, 27-31 января, 2014), стр. 43-51;

2. Першина Е.В., Капралова М.В., Архипов В.И. Экспрессия мГлу4 рецепторов в мозге крыс после их фармакологической активации с помощью TCN 238. Сборник тезисов 18-той Международной Пущинской школы – конференции молодых учёных «Биология наука XXI века» (Пушино, 21-25 апреля, 2014), стр.356;

3. Архипов В.И., Гордон Р.Я., Капралова М.В., Першина Е.В. Нейропротективные эффекты модуляторов метаботропных рецепторов глутамата в экспериментальной модели эксайтотоксичности. Сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 90-летию со дня рождения академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана

«Инновации в фармакологии: от теории к практике» (Санкт-Петербург, 27-28 октября, 2014), стр.11-13;

4. Першина Е.В. Изучение экспрессии метаботропных рецепторов глутамата при эксайтотоксичности. Сборник тезисов Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика -2014» (Пушино, 27-29 октября) стр.116;

5. Першина Е.В., Капралова М.В., Архипов В.И. Экспрессия субъединицы альфа1 ГАМК_A рецептора в мозге крыс при эксайтотоксичности, вызванной каинатом. Сборник тезисов 19-той Международной Пушинской школы – конференции молодых учёных «Биология наука XXI века» (Пушино, 20-24 апреля, 2015), стр.361;

6. Архипов В.И., Першина Е.В., Гордон Р.Я. Особенности нейродегенеративных процессов в гиппокампе. Сборник тезисов III Всероссийской конференции с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пушино, 7-11 сентября 2015), стр.52;

7. Першина Е.В. Исследование экспрессии рецепторов ГАМК и глутамата при фармакологическом влиянии на активность глутаматергической системы. Сборник тезисов Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика 2015» (Пушино, 2-3 ноября, 2015), стр. 95;

8. Першина Е.В., Архипов В.И. Исследование экспрессии гена станнина в гиппокампе крыс при нейродегенерации, вызванной триметилоловом. Сборник тезисов 20-той Международной Пушинской школы – конференции молодых учёных «Биология наука XXI века» (Пушино, 18-22 апреля, 2016), стр.286;

9. Першина Е.В., Гордон Р.Я., Архипов В.И. Особенности нейродегенерации, индуцированной каинатом и триметилоловом в гиппокампе. В сборнике XII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 5-11 июня, 2016), стр. 317;

10. Першина Е.В., Архипов В.И. Роль метаботропных рецепторов глутамата при повреждении гиппокампа крыс хлоридом триметилолова. В сборнике тезисов V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. (Санкт-Петербург, 18-21 сентября. 2016) стр.47-48;

11. Першина Е.В., Архипов В.И. Изучение механизмов действия нейротоксиканта хлорида триметилолова на мозг крыс. В сборнике тезисов XVI Всероссийская конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 1-3 ноября, 2016), стр. 53;

12. Першина Е. В., Михеева И.Б., Архипов В.И. Экспрессия генов метаботропных рецепторов глутамата в гиппокампе крыс при нейродегенерации, вызванной хлоридом триметилолова. В материалах XXIII съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова. (Воронеж, 18-22 сентября, 2017)

стр. 625-627;

13. Першина Е.В., Архипов В.И., Исследование динамики экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата для выявления мишеней фармакологической коррекции нейродегенерации. В сборнике тезисов Всероссийской молодежной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика '17»(Пушино, 1 ноября, 2017) стр. 34-35;

14. Першина Е.В., Камалтдинова Э.Р., Михеева И.Б., Архипов В.И., Исследование нарушений гиппокампа у крыс при действии хлорида триметилолова. В сборник тезисов «Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 17-22 февраля 2018) стр.69.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

COX2 — циклооксигеназа 2;

LY354740 — (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-2-aminobicyclo [3.1.0] hexane-2,6-dicarboxylic acid);

МРЕР — 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride (2-метил-6-(фенилэтинил) пиридина гидрохлорид);

НМДА — N-метил-D-аспартат;

ТСН 238 — (E)-4-(2-Phenylethenyl)-2-pyrimidinamine ((E) -4- (2-фенилэтенил) -2-пиримидинамин);

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота;

ГЭБ — гемато-энцефалический барьер;

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

кДНК — кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота;

КК — каиновая кислота;

мГлуР — метаботропные рецепторы глутамата;

мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота;

п.н. — пара нуклеотидов;

ПЦР — полимеразная цепная реакция;

РНК — рибонуклеиновая кислота;

ТМТ — хлорид триметилолово;

ЦНС — центральная нервная система.