



АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НЕЙРОБИОЛОГИИ

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ, ПОСВЯЩЁННАЯ
ПАМЯТИ АКАДЕМИКА ЕВГЕНИЯ ЕВГЕНЬЕВИЧА НИКОЛЬСКОГО

КАЗАНЬ, 9–12 СЕНТЯБРЯ 2019 ГОДА

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Казанский институт биохимии и биофизики
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр
Российской академии наук»
Казанский федеральный университет
Казанский государственный медицинский университет
Отделение физиологических наук Российской академии наук
Российский фонд фундаментальных исследований

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НЕЙРОБИОЛОГИИ

Международная конференция
«Актуальные проблемы нейробиологии»

X Всероссийская школа молодых учёных, посвящённая памяти
академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского

Сателлитный симпозиум «От нейрона к мозгу»

Казань, 9–12 сентября 2019 г.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ



КАЗАНЬ
2019

УДК 612
ББК 28:707.3
А43

Печатается при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
(грант № 19-015-20019).

Под общей редакцией:
доктора биологических наук, профессора **Э. А. Бухараевой**,
доктора медицинских наук, член-корр. РАН **А. Л. Зефирова**

Редакционная коллегия:
доктор биологических наук, профессор **П. Д. Брежестовский**,
доктор биологических наук, профессор **Г. Ф. Ситдикова**,
доктор медицинских наук, профессор **Р. А. Гиниятуллин**,
кандидат биологических наук **В. Ф. Хузахметова**

А43 **Актуальные проблемы нейробиологии:** Международная конференция «Актуальные проблемы нейробиологии»; X Всероссийская школа молодых учёных, посвящённая памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского; сателлитный симпозиум «От нейрона к мозгу» (Казань, 9–12 сентября 2019 г.). Тезисы докладов / под общ. ред.: Э. А. Бухараевой, А. Л. Зефирова. – Казань: Издательство Казанского университета, 2019. – 176 с.

ISBN-978-5-00130-195-0

Сборник включает в себя тезисы докладов участников Международной конференции «Актуальные проблемы нейробиологии», X Всероссийской школы молодых учёных, посвящённой памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского, и сателлитного симпозиума «От нейрона к мозгу».

УДК 612
ББК 28:707.3

ISBN-978-5-00130-195-0

© Издательство Казанского университета, 2019
© КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, 2019

Казанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» проводит Международную конференцию «Актуальные проблемы нейробиологии» и X Всероссийскую школу молодых учёных, посвящённую памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского – инициатора и на протяжении многих лет председателя Оргкомитета таких школ в Казани.

Начиная с 1972 года было проведено 9 Всероссийских школ молодых учёных, на которых в качестве лекторов выступали ведущие учёные-нейробиологи России, Украины, Чехии, Великобритании, Франции и других стран. Все участники проведенных школ отмечали высокий научный и организационный уровень этих встреч, творческую атмосферу и возможность свободного общения молодежи с ведущими российскими и зарубежными учёными, а также подчеркивали целесообразность регулярного проведения таких мероприятий.

Школа 2019 года посвящена памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского – ведущего нейробиолога России, известного в мировом научном сообществе. Инициативу проведения школы поддержали учёные и преподаватели Казанского государственного медицинского университета, где Е. Е. Никольский в течение более 30 лет заведовал кафедрой медицинской и биологической физики, Казанского (Приволжского) федерального университета, в котором Е. Е. Никольским создана лаборатория Нейрофармакологии. В работе школы принимают более 100 молодых учёных из Казани и других научных центров страны. В качестве докладчиков приглашены проф. Ф. Выскочил (Чехия) и проф. К. Слейтер (Великобритания), проф. П. Д. Брежестовский и проф. Р. Н. Хазипов (Франция), проф. Р. А. Гиниатуллин (Финляндия), а также академики РАН Л. Г. Магазаник, М. В. Угрюмов, М. А. Островский, член-корреспонденты РАН П. М. Балабан, А. В. Семьянов, А. Л. Зефириков и другие ведущие учёные Москвы, Санкт-Петербурга и других городов, которые имели тесные научные контакты с академиком Е. Е. Никольским.

Первая Всесоюзная школа молодых учёных «Актуальные проблемы нейробиологии» была проведена в Казани 1972 году по инициативе казанских нейробиологов при поддержке Отделения биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР. Учитывая высокий научный и организационный уровень проведения школы, Отделение биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений приняло решение сделать школу регулярной. В 1978, 1981 и 1984 гг. в Казани были проведены, соответственно, II, III и IV школы по нейробиологии. К чтению лекций были привлечены ведущие нейробиологи, что позволяло знакомить слушателей школы с современным состоянием нейробиологической науки в мире. Одним из первых организаторов этих школ был профессор Казанского государственного медицинского университета Эрнст Галимович Улумбеков.

В 1998 году благодаря гранту ФЦП «Интеграция» появилась возможность возродить традицию проведения в Казани молодёжных нейробиологических школ. Инициатором и председателем Оргкомитета возрожденных школ стал Евгений Евгеньевич Никольский. Учитывая высокий авторитет казанских нейробиологов и большое значение школ для подготовки молодых научных кадров, правительство Республики Татарстан и Академия наук Республики Татарстан, Российская академия наук всячески поддерживали реализацию этого проекта.

С тех пор в Казани вплоть до 2007 г. были проведены, соответственно, V, VI, VII, VIII и IX Всероссийские школы молодых учёных по нейробиологии. В работе школ принимали участие такие известные нейробиологи, как академики РАН и НАН Украины П. Г. Костюк и В. И. Скок (Киев), в те времена ещё члены-корреспонденты РАН Л. Г. Магазаник (Санкт-Петербург), М. В. Угрюмов (Москва), В. А. Ткачук (Москва), Л. М. Чайлахян (Пушино), Л. И. Корочкин (Москва), академик РАЕН Д. А. Сахаров (Москва), проф. Ф. Высокчил (Чехия), проф. Л. Виклицкий (Чехия), проф. Д. Бернсток (Великобритания), проф. П. Д. Брежестовский (Франция), проф. М. Б. Быховская (США) и другие.

В 2005 году Е. Е. Никольский организовал проведение в Казани школы мирового масштаба под эгидой Международного общества исследования мозга (IBRO). В качестве лекторов выступили самые известные в мировой нейробиологической науке учёные – автор учебника «From neuron to brain» Джон Никколс, со-председатель Международного общества исследований мозга Джон Мак-Маен (Stanford), проф. Андреа Нистри (Trieste), проф. Кларк Слейтер (Newcastle), проф. Рашид Гиниатуллин (Kuopio), проф. Петр Брежестовский (Marseille).

В 2007 г. по инициативе Е. Е. Никольского была проведена ещё одна масштабная международная школа, входящая в программу Европейских школ

по нейронаукам (Programme of European Neuroscience Schools). В течение двух недель молодые учёные не только слушали лекции нейробиологов из России и зарубежья, таких как Пьер Ашер (Франция), Йезекиль Бен-Ари (Франция), Эрик Крейчи (Франция), Йорген Клингауф (Германия), Лев Магазаник (Санкт-Петербург), Павел Балабан (Москва) и многих других выдающихся учёных, но и участвовали в практических занятиях в нейробиологических лабораториях казанских институтов.

Участники всех проведенных школ всегда отмечали высокий научный и организационный уровень этих встреч, творческую атмосферу и возможность свободного общения молодёжи с ведущими российскими и зарубежными учёными, а также подчеркивали целесообразность регулярного проведения таких мероприятий.

X школа 2019 года посвящена памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского – ведущего нейробиолога России, известного в мировом научном сообществе.

Конференция проводится при финансовой поддержке

- Министерства науки и высшего образования РФ
- Российского фонда фундаментальных исследований
- ООО «Мерк»
- ООО НПФ «Биотехнологии»
- ООО «Никон»
- ООО «Химмед-Поволжье»
- ООО «Диаэм»

СОДЕРЖАНИЕ

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Неквантовая секреция ацетилхолина в миокарде <i>Абрамочкин Д.В.</i>	2
Мембранные корреляты обучения у моллюсков: роль серотонина и оксида азота <i>Гайнутдинов Х.Л.</i>	3
Функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы и гарантийный фактор нервно-мышечной передачи <i>Кривой И.И.</i>	5
Становление теории о неквантовом выделении нейромедиатора <i>Маломуж А.И.</i>	7
Cholinesterases: from structure to functions <i>Masson P., Lushchekina S.</i>	9
Исследование нейротоксических эффектов пренатальной гипергомоцистеинемии <i>Ситдикова Г.Ф.</i>	10
Homocysteinemia induces mechanical allodynia via PKC-dependent enhancement of Cav3.2 T-type channel surface expression <i>Weiss N.</i>	12

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

Секция «Передача возбуждения в периферических синапсах»

Исследование изменения свойств серотониновых рецепторов командных нейронов виноградной улитки после обучения <i>Богодвид Т.Х., Андрианов В.В., Дерябина И.Б., Муранова Л.Н., Силантьева Д.И., Гайнутдинов Х.Л.</i>	14
Экзоцитоз и эндоцитоз синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях в условиях нарушения функции септинов <i>Григорьев П.Н., Хисамиева Г.А., Зефиоров А.Л.</i>	16
Зависимость реконсолидации контекстуальной памяти у виноградной улитки от серотонина <i>Дерябина И.Б., Муранова Л.Н., Андрианов В.В., Богодвид Т.Х., Гайнутдинов Х.Л.</i>	17

Влияние мускариновых рецепторов на процесс входа кальция в моторные окончания мышцы <i>Жиляков Н.В., Архипов А.Ю., Самигуллин Д.В.</i>	19
Окисленные формы холестерина как модуляторы экзоцитоза в нервно-мышечном синапсе мышцы <i>Закирьянова Г.Ф., Петров А.М.</i>	21
Участие KCNQ-каналов в регуляции вызванной секреции ацетилхолина из двигательных нервных окончаний лягушки и мышцы <i>Ковязина И.В., Ценцевичский А.Н., Хузахметова В.Ф.</i>	23
Влияет ли аллостерический модулятор катионного nAHP $\alpha 7$ -типа PNU-120596 на анион-проводящие рецепторы? <i>Лебедев Д.С., Вульфюс Е.А., Крюкова Е.В., Цетлин В.И.</i>	24
Молекулярное моделирование реакций холинэстераз <i>Луцкекина С.В., Массон П., Махаева Г.Ф., Петров К.А., Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Варфоломеев С.Д.</i>	26
R2X7-рецепторы осуществляют кальций-зависимую регуляцию нервно-мышечной передачи у мышей, нокаутных по гену паннексина 1 <i>Митева А.С., Молчанова А.И., Гайдюков А.Е., Балезина О.П.</i>	27
Изменение секреции медиатора в двигательном нервном окончании теплокровных и холоднокровных животных при закислении внутриклеточной среды <i>Мухамедзянов Р.Д., Захаров А.В., Зефиоров А.Л.</i>	29
Нифлумовая кислота – блокатор хлор-проницаемых рецептор-активируемых цис-петельных каналов <i>Пономарева Д.Н., Петухова Е.О., Михайлова Н.В., Брежестовский П.Д.</i>	31
Активация NMDA-рецепторов в нервно-мышечном синапсе как механизм модуляции мембранного потенциала покоя мышечной клетки <i>Проскурина С.Е., Петров К.А.</i>	33
Анализ природы изменений параметров спонтанной секреции медиатора, индуцированных γ -S-АТФ, в моторных синапсах мышцы <i>Прознса Гарсия А., Богачева П.О., Балезина О.П.</i>	35
ГАМКергическая система в онтогенезе мышечных волокон <i>Сибгатуллина Г.В., Маломуж А.И.</i>	37
Роль BDNF в пресинаптической модуляции вызванной секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышцы <i>Тарасова Е.О., Гайдюков А.Е., Балезина О.П.</i>	39

Исследование эффектов антагониста NMDA-рецепторов МК-801 на электрические характеристики спонтанно-активных нейронов моллюска <i>Helix lucorum</i> <i>Фролова А.В., Силантьева Д.И., Андрианов В.В., Гайнутдинов Х.Л.</i>	41
Оценка экспрессии белков нервно-мышечного синапса скелетных мышц трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза <i>Хабибрахманов А.Н., Нуруллин Л.Ф., Мухамедьяров М.А.</i>	43
Пренатальная гипергомоцистеинемия влияет на двигательную активность и созревание нервно-мышечных синапсов крыс <i>Яковлева О.В., Хузахметова В.Ф., Бухараева Э.А., Ситдикова Г.Ф.</i>	44
Оксидативный стресс и нарушение секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе мышей с аллоксановым диабетом <i>Ярмиев И.З., Яковлева О.В.</i>	46
СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ	
Сателлитный симпозиум «От нейрона к мозгу»	
Изменение пространственной памяти у животных с пренатальным стрессом <i>Богатова К.С., Мухтарова Р.А.</i>	49
Модуляция амплитудно-временных параметров вызванной кортикальной активности в ответ на изменения сенсорного входа в бочонковой системе новорожденных крыс <i>Борисова А.В., Шарипзянова Л.С., Сучков Д.С., Шумкова В.В., Минлебаев М.Г.</i>	51
Энторинально-гиппокампальный диалог в раннем постнатальном периоде развития у крыс <i>Валеева Г., Яначкова С., Рычкова В., Насретдинов А., Макаров Р., Холмс Г.Л., Хазипов Р., Ленк-Сантини П.-П.</i>	53
Морфологические и функциональные особенности ранней фазы развития фокального ишемического инсульта, вызванного эпипиальной аппликацией эндотелина <i>Винокурова Д., Захаров А., Лотфуллина Н., Бурханова Г., Чернова К., Лебедева Ю., Хазипов Р.</i>	54
Нейроэндокринные механизмы стресс-протективных эффектов гипоксического посткондиционирования в модели депрессии у крыс <i>Зенько М.Ю.</i>	56

- Анализ нарушений научения и памяти в крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией при лечении донором сероводорода
Зиганшина А.Р. 58
- Анализ экспрессии проапоптотических и антиапоптотических белков при нейропротекторном действии форсколина в условиях эксайтотоксичности в нейронах мозжечка и коры головного мозга крыс
Иванова М.А., Абушик П.А., Антонов С.М. 60
- Анализ экспрессии генов *Rac1*, *Bcl2*, *Cav1 α* и *Cav1 β* клеток нейробластомы, мезенхимных стволовых клеток и мононуклеарных клеток периферической крови человека при моделировании опухолевого микроокружения *in vitro*
Китаева К.В., Чулпанова Д.С., Прудников Т.С., Клетухина С.Р., Ризванов А.А., Соловьева В.В. 62
- Роль нмда-рецепторов в механизме действия сероводорода на сетевую активность гиппокампа крыс
Курмашова Е.Д., Гатаулина Э.Д., Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В. 64
- Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на вызванные НМДА-ответы пирамидных нейронов СА3 зоны гиппокампа крыс
Курмашова Е.Д., Гатаулина Э.Д., Яковлев А.В. 66
- Гамма-осцилляции при распространяющейся депрессии в соматосенсорной коре крыс
Насретдинов А., Винокурова Д., Лотфуллина Н., Бурханова Г., Чернова К., Лебедева Ю., Хазипов Р. 68
- Изучение поведенческих эффектов КАПАХ – препарата с мультитаргетным механизмом действия – на модели болезни Альцгеймера у крыс, вызванной стереотаксическим введением бета-амилоида в область гиппокампа
Никитин Д.О., Никитина А.В., Семина И.И. 69
- Изучение поведенческих нарушений у крыс с моделью аутизма и разработка подходов для их лекарственной коррекции
Никитина А.В., Никитин Д.О., Семина И.И., Шиловская Е.В. 71
- Механизмы асинхронного выброса нейромедиатора в холецистокинин-положительных синапсах гиппокампа мыши *in vitro*
Рахматуллина Ф.Ф., Вазетдинова А.А., Розов А.В. 73
- Оценка взаимосвязи между адаптивными возможностями и речевыми нарушениями у детей с РАС
Семина И.И., Яхин К.К., Сабиров И.С., Сафиуллина Л.Р., Валеева Е.В. 75

- Корреляция активности инфрагранулярных и гранулярных слоёв во время ранних ритмов активности в бочонковой коре соматосенсорной системы новорожденных крыс
Сучков Д.С., Минлебаев М.Г. 77
- Анализ противоопухолевой активности мезенхимных стволовых клеток, нагруженных препаратом цисплатин, в культуре клеток нейробластомы *in vitro*
Тазетдинова Л.Г., Чулпанова Д.С., Фазлеева И.И., Филин И.Ю., Соловьева В.В., Ризванов А.А. 79
- Роль гиалуроновой кислоты в нейросетевой активности гиппокампа на 26 день *in vitro*
Ткаченко Н.М., Гладков А.В., Мухина И.В. 81
- Влияние интервальной гипоксии на двигательную активность крыс после моделирования ишемии головного мозга
Токальчик Ю.П. 83
- Нейропротекторные эффекты лактата и пирувата в клеточных моделях болезни Паркинсона
Федотова Е.И., Бережнов А.В. 85
- Экспрессия транспортного белка GAT-1 в респираторном ядре (комплекс Бетцингера) в ранний постнатальный период в норме и при пренатальном дефиците серотонина
Хожай Л.И. 87
- Особенности флуоротил-индуцированной эпилепсии у крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией
Чернова К.А., Бурханова Г.Ф., Ситдикова Г.Ф., Герасимова Е.В. 89
- Анализ взаимодействия мезенхимных стволовых клеток со сверхэкспрессией фосфатазы PTEN и клеток нейробластомы человека при совместном культивировании *in vitro*
Чулпанова Д.С., Соловьева В.В., Ризванов А.А. 91
- Разработка и анализ функциональности плазмидной генотерапевтической конструкции, кодирующей гексозаминидазу А, для терапии болезни Тея-Сакса
Шаймарданова А.А., Чулпанова Д.С., Соловьева В.В., Ризванов А.А. 93
- Механизмы генерации тканевой компоненты внутреннего оптического сигнала в соматосенсорной коре новорожденных крыс *in vivo*
Шарипзянова Л., Сучков Д., Minlebaev M. 95
- Митохондрия-эндоплазматические контакты диссоциированных клеток при воздействии острой нормобарической гипоксии *in vitro*
Широкова О.М., Мищенко Т.А., Мухина И.В., Ведунова М.В. 97

- Ultrastructural and functional mitochondrial changes induced by oxygen-glucose deprivation in the rat barrel cortex *in vitro*
Juzekaeva E.R., Arkhipova S.S., Sofronova S.A., Mukhtarov M.R., Khazipov R.N. 99
- Развитие нейроваскулярного взаимодействия в соматосенсорном неокортексе новорожденных крыс
Ямолдин А.А., Сучков Д.С., Кульмаматьева А.Р., Минлебаев М.Г. 100
- СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ**
Секция «Развитие нейробиологии: новые представления и методы»
- Исследование уровня окислительного стресса при различных моделях сахарного диабета у мышей
Альбова П.Е., Березин С.Р., Калигин М.С., Яковлева О.В. 103
- Изменения в цитокиновом профиле супернатантов микроглии при разной степени травмы спинного мозга
Ахметзянова Э.Р., Журавлева М.Н., Мухамедишина Я.О. 105
- Воздействие разных концентрации серотонина и адреналина на миокард правого желудочков сердца крыс линии вистар в хроническом эксперименте
Ахметова М.Ж., Нигматуллина Р.Р., Миндубаева Ф.А. 107
- Молекулярные механизмы развития атрофических процессов в постуральных и локомоторных мышцах при ограничении двигательной активности
Белова С.П., Мочалова Е.П., Тыганов С.А., Шенкман Б.С. 109
- Динамика экспрессии мРНК ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α в вентральном и дорсальном гиппокампе крыс в первые две недели после черепно-мозговой травмы
Бутузов А.В., Комольцев И.Г., Волобуева М.Н., Третьякова Л.В., Квичанский А.А., Гуляева Н.В., Большаков А.П. 111
- Повышение уровней кортикостерона и провоспалительных цитокинов в крови и гиппокампе крыс в первые две недели после черепно-мозговой травмы
Волкова А.А., Комольцев И.Г., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В., Гуляева Н.В. 113
- Протеогликаны поверхностного компартмента нейронов при травме спинного мозга
Кабдеш И.М., Пovyшьева Т.В., Мухамедишина Я.О., Чельшев Ю.А. 115
- Восприятие звуковых последовательностей с локальной и глобальной нерегулярностями в третьей стадии сна
Левкович К.М., Украинцева Ю.В., Шилов М.О., Мартынова О.В. 116

Количественные изменения перинейрональных сетей в развитии и посттравматическом состоянии <i>Мельникова А.А., Липачев Н.С., Арнст Н.И., Кочнева А.А., Яаалиноя Х., Жигалов А., Карпова Н., Кулесская Н., Мавликеев М.О., Раувала Х., Киясов А.П., Павельев М.Н.</i>	118
Изменение экспрессии мышечноспецифичных E3-убиквитинлигаз в ответ на блокирование работы HDAC1 при функциональной разгрузке постуральных мышц крысы <i>Мочалова Е.П., Белова С.П., Немировская Т.Л.</i>	119
Иммунофлуоресцентное исследование дистрофина в <i>m. soleus</i> крыс после опорной разгрузки и реадaptации на ранних сроках <i>Нигметзянов И.Р., Нуруллин Л.Ф., Тяпкина О.В. Гусев О.А.</i>	121
Иммунофлуоресцентное исследование синаптоподина в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга мышей после опорной разгрузки и реадaptации <i>Николаева Е.А., Гайчик О.В., Нуруллин Л.Ф., Тяпкина О.В.</i>	122
Влияние AMPK на инициацию аутофагии в <i>m. soleus</i> крысы в условиях гравитационной разгрузки <i>Парамонова И.И., Вильчинская Н.А., Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С.</i>	123
Интраназальное введение пэгилированных и акрилоилированных полимеров как носителей для доставки лекарственных веществ в мозг <i>Порфирьева Н.Н., Мустафин Р.И., Хуторянский В.В.</i>	124
Оценка влияния локальной гипотермии на функциональное состояние спинальных двигательных центров через 30 суток после травмы спинного мозга у крыс <i>Раимова М.В., Лобан Е.Ю., Силантьева Д.И., Балтина Т.В.</i>	126
Сигнальная система, управляющая конусом роста аксона при воздействии электрическим полем <i>Рамазанова И.Ф., Котов Н.В.</i>	128
Исследование уровня холин оксидазы в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга мышей после опорной разгрузки и реадaptации <i>Россомахин Р.А., Нуруллин Л.Ф., Тяпкина О.В.</i>	130
Уровень активности коры больших полушарий во фронтальной области и зоне вертекса при действии NaCl и C ₆ H ₁₂ O ₆ в качестве вкусовых раздражителей <i>Саваневская Е.Н.</i>	131

- Активация транскрипции мутантного гена дисферлина в фибробластах кожи человека с использованием технологии CRISPR-Cas9 SAM как тест-система для подбора лекарственных препаратов при дисферлинопатиях
Старостина И.Г., Шаймарданова А.А., Соловьева В.В., Аглиуллина Д.Р., Яковлев И.А., Деев Р.В., Исаев А.А., Ризванов А.А. 133
- Влияние опорной стимуляции на анаболические процессы в камбаловидной мышце крысы на фоне 7-суточного вывешивания
Тыганов С.А., Мочалова Е.П., Белова С.П., Рожков С.В., Калашиников В.Е., Шенкман Б.С. 135
- Иммунофлуоресцентное исследование ATG8 в *m. soleus* мышей после опорной разгрузки и реадaptации
Тяпкина О.В., Нуруллин Л.Ф., Дмитриева С.А. 137
- Острые судорожные приступы после латерального гидродинамического удара, наносимого крысам в свободном поведении
Франкевич С.О., Комольцев И.Г., Гуляева Н.В. 138
- NFAT-зависимые механизмы регуляции фенотипа волокон камбаловидной мышцы крыс при гравитационной разгрузке
Шарло К.А., Львова И.Д., Каламкаргов Г.Р., Шенкман Б.С. 140
- Влияние инерции дневного сна на компоненты вызванных потенциалов при распознавании трудноразличимых звуков
Шилов М.О., Левкович К.М., Мартынова О.В., Украинцева Ю.В. 142
- Степень повреждения функциональных зон неокортекса крыс коррелирует с поведенческими отклонениями в остром периоде черепно-мозговой травмы
Широбокова Н.И., Комольцев И.Г., Гуляева Н.В. 144
- Исследование влияния низкочастотной электромиостимуляции, проводимой в ходе «сухой» иммерсии, на характеристики вертикальной стойки
Шишкин Н.В., Амирова Л.Е., Резванова С.Ю., Томиловская Е.С. 146
- АВТОРСКИЙ ИНДЕКС 148

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Неквантовая секреция ацетилхолина в миокарде

Абрамочкин Д.В.^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Парасимпатическая регуляция крайне важна для нормального функционирования сердца, адекватного потребностям организма. В последнее время появляется всё больше данных, прямо указывающие на важнейшую защитную роль парасимпатических влияний, в частности, при ишемическом повреждении. Усиление естественного кардиопротекторного влияния основного парасимпатического медиатора, ацетилхолина (АХ), при помощи мягких ингибиторов ацетилхолинэстеразы, разрушающей АХ в сердечной ткани, предлагается в качестве нового подхода в терапии постинфарктных состояний, в дополнение к широко используемым адреноблокаторам. В связи с этим, глубокое исследование механизмов холинергической регуляции миокарда представляется крайне важной задачей для современной физиологии.

В докладе будут обобщены результаты многолетних электрофизиологических исследований на препаратах миокарда млекопитающих, а также представителей других классов позвоночных, в которых удалось продемонстрировать наличие во внутрисердечных парасимпатических нейронах особого неквантового (невезикулярного) способа секреции АХ. Неквантовый механизм секреции дополняет классический квантовый (везикулярный) способ секреции, но в отличие от него не связан с выбросом синаптических везикул, накапливающих АХ. Данный механизм реализуется за счёт работы транспортеров обратного захвата холина высокого сродства, которые могут как закачивать холин, продукт распада АХ, внутрь нейрона, так и выводить сам АХ наружу. Важно отметить, что неквантовая секреция АХ является не неконтролируемой утечкой нейромедиатора из нейронов, а регулируемым процессом. В частности, она ингибируется оксидом азота и норадреналином, нейромедиатором симпатических нейронов. Предполагается, что наиболее важное значение неквантовый путь секреции АХ имеет на ранних стадиях онтогенеза, поскольку у крыс в конце пренатального онтогенеза АХ выделяется из внутрисердечных парасимпатических нейронов только неквантовым способом.

Мембранные корреляты обучения у моллюсков: роль серотонина и оксида азота

Гайнутдинов Х.Л.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Процессы обучения и памяти лежат в основе изменения поведения и составляют основное содержание интегративной деятельности мозга. Одна из наиболее интригующих интегративных функций мозга – это его способность хранить информацию, полученную в опыте, и вспоминать большую его часть. Память можно определить как процесс, состоящий в запоминании, хранении и воспроизведении приобретенного опыта. Всегда остаётся важным этап сохранения результатов обучения. Стадию долговременной памяти, которая является результатом обучения, хорошо можно тестировать через процесс реконсолидации памяти. В рамках проблемы клеточных механизмов обучения можно выделить несколько конкретных задач: это анализ мембранных характеристик нейронов и синаптической передачи, от которых зависит возбудимость как пресинаптических, так и постсинаптических структур, к каковым относятся мембранный и пороговый потенциалы, это роль ионов Ca^{2+} и цАМФ в индукции ассоциативных и неассоциативных форм обучения, а также нейромедиаторы. Доказано, что серотонин (5-НТ) является основным медиатором, который опосредует оборонительное поведение у моллюсков, поэтому роль серотонинергической системы в выработке условных оборонительных рефлексов у моллюсков трудно переоценить. Открытие способности клеток млекопитающих к синтезу свободного радикала оксида азота (NO) стимулировало огромные усилия исследователей к изучению роли NO во всех областях биологии и медицины. Показано, что серотонин и доноры NO взаимно усиливают эффекты друг друга. Показано, что NO играет роль межклеточного мессенджера и сигнальной молекулы также у моллюсков. Обнаружено, что NO координирует ряд поведенческих программ у моллюсков, найдено, что NO участвует в процессах обучения и памяти. Недавно стало известно, что NO необходим, как для обучения, так и для стирания памяти. Показано участие NO в пластических изменениях синаптической передачи в различных системах, в том числе для нервной системы винogradной улитки. Имеются данные, что NO может служить внутриклеточным модулятором нейрональной возбудимости. Речь идёт об NO, который продуцируется в самом нейроне. Эффекты являются двойственными, противоположными для разных типов клеток.

Поэтому нами было проведено исследование роли 5-НТ и NO в механизмах обучения поведенческими и электрофизиологическими методами с применением инъекций 5-НТ, его нейротоксических аналогов 5,6-DHT и 5,7-DHT и предшественника его синтеза 5-НТП в тело животного, а также с применением доноров и блокаторов NO-синтаз и ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ. Для экспериментов была выбрана виноградная улитка *Helix lucorum*, нервная система которой хорошо описана. Обнаружено,

что одноразовое и хроническое введение блокатора NO-синтаз L-NAME нарушает выработку условных рефлексов, также найдено, что ингибитор растворимой гуанилатциклазы – ODQ ускоряет обучение. Найдено также, что NO необходим для процесса реконсолидации памяти, причём речь идёт только о работе нейрональной и эндотелиальной NO-синтаз.

Наша работа посвящена исследованию механизмов формирования ассоциативного обучения на основе оборонительного рефлекса у виноградной улитки. Для анализа роли 5-НТ создавался его временный дефицит при помощи нейротоксических аналогов 5,6/5,7-DHT, использовался предшественник синтеза 5-НТ 5-НТР, а также введение самого 5-НТ в гемолимфу улитки. Полученные результаты показывают, что при истощении 5-НТ условный рефлекс не вырабатывается. Одной из причин таких эффектов, видимо является истощение 5-НТ в нервной системе моллюска при воздействии нейротоксина. Ранее нами было найдено, что формирование условного оборонительного рефлекса у виноградной улитки сопровождается деполяризационным сдвигом мембранного потенциала и снижением порогового потенциала (Gainutdinov et al., 1998). В последние годы появилось достаточное количество экспериментальных результатов, свидетельствующих о мембранных коррелятах обучения.

С другой стороны, показано, что ежедневная инъекция 5-НТ и предшественника его синтеза 5-НТР перед сеансом обучения ускоряет обучение, а ежедневная инъекция 5-НТР перед сеансом обучения на фоне дефицита 5-НТ, созданного нейротоксином 5,7-DHT, возвращает способность животных к обучению. Объяснение этому факту можно найти в данных D.J. Fickbohm et al. (2005). С использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммунохимии они показали, что в мозге моллюска *Tritonia* после выдерживания в течение 30 мин в растворе 2 ммоль 5-НТР содержание 5-НТР резко увеличивается на протяжении более 20 часов и наблюдается также увеличение содержания серотонина в специфических областях мозга. Отличие наших экспериментов от их работы заключается в том, что мы не только проводили инъекцию 5-НТ и 5-НТР, но и одновременно производили выработку условного рефлекса, т.е. имели дело с одновременным действием двух факторов.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

Функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы и гарантийный фактор нервно-мышечной передачи

Кривой И.И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Проблема пластичности синаптической функции и нервной системы в целом одна из важнейших в современной нейрофизиологии. Холинергический нервно-мышечный синапс скелетной мышцы остаётся традиционной моделью исследований в этой области, выдающийся вклад в развитие которой внёс академик РАН Евгений Евгеньевич Никольский. Моторная концевая пластинка нервно-мышечного синапса позвоночных представляет собой высокоспециализированную область сарколеммы, лежащую непосредственно под двигательным нервным окончанием и характеризующуюся исключительно высокой плотностью распределения никотиновых холинорецепторов (нХР). После освобождения квантов ацетилхолина (АХ) из нервного окончания молекулы АХ взаимодействуют с нХР, что приводит к генерации потенциала концевой пластинки (ПКП). Процесс трансформации локального ПКП в распространяющийся потенциал действия (ПД) мышечного волокна является одним из ключевых этапов, от которого зависит не только надёжность нервно-мышечной передачи, но и её пластичность.

Гарантийный фактор нервно-мышечной передачи определяется как отношение амплитуды ПКП к порогу генерации мышечного ПД. Поэтому поддержание определённого уровня мембранного потенциала покоя (МПП) скелетного мышечного волокна является обязательным условием нормального функционирования нервно-мышечного аппарата. Деполяризация мембраны ведёт к инактивации натриевых каналов и уменьшению её возбудимости, нарушению генерации и проведения ПД, а также к нарушению функционирования системы электромеханического сопряжения; гиперполяризация мембраны оказывает противоположное действие. Наиболее серьёзные последствия нарушений электрогенеза для постсинаптической области мышечной мембраны. Даже относительно небольшая, но длительная деполяризация этого района мембраны и сопутствующая инактивация натриевых каналов приводят к росту порога генерации мышечного ПД, и, следовательно, к снижению гарантийного фактора нервно-мышечной передачи.

Как было установлено работами академика Е. Е. Никольского и соавторов, мембрана скелетного мышечного волокна млекопитающих не эквипотенциальна и область концевой пластинки дополнительно гиперполяризована по сравнению с внесинаптической мембраной. Эта локальная гиперполяризация имеет важное физиологическое значение и, по данным авторов, возникает вследствие активации электрогенного Na,K-насоса негидролизированным АХ, присутствующим в синаптической щели в наномолярных концентрациях даже при активной ацетилхолинэстеразе (Nikolsky et al., 1994).

Эта важнейшая экспериментальная находка стала отправной точкой для последующих исследований, которые позволили установить следующее. В скелетной мышце экспрессируются альфа1- и альфа2-изоформы каталити-

ческой и транспортной альфа-субъединицы Na,K-АТФазы. Альфа1-изоформа Na,K-АТФазы в скелетной мышце выполняет основную функцию ионного насоса и функционально является более стабильной. Альфа2-изоформа гораздо более пластична, что проявляется в специфической зависимости её функционирования от ряда факторов (регуляция наномолярными концентрациями АХ и циркулирующего эндогенного убаина, зависимость от уровня мембранного холестерина, условий двигательной активности и др.). Существуют два основных пула альфа2-изоформы Na,K-АТФазы. Основной пул этой изоформы находится в Т-системе мышечных волокон; меньший пул альфа2-изоформы сосредоточен области концевой пластинки, где этот белок ко-локализован и молекулярно связан с нХР. Локальная гиперполяризация мембраны обусловлена повышением электрогенной активности альфа2-изоформы за счёт её функционального и молекулярного взаимодействия с нХР, причём в этом взаимодействии принимает участие также мембранный холестерин.

Таким образом, локальная гиперполяризация мембраны может рассматриваться как важный механизм структурно-функциональной организации нервно-мышечного синапса, в частности, как фактор, препятствующий инактивации натриевых каналов в этом районе сарколеммы при длительной интенсивной двигательной активности. По-видимому, неслучайно локальная гиперполяризация отсутствует не только в условиях различных типов миодистрофии, но исчезает уже на ранних этапах двигательной дисфункции, причём одновременно с нарушением функционирования альфа2-изоформы Na,K-АТФазы.

Наши новые данные свидетельствуют, что циркулирующий в наномолярных концентрациях убаин, уровень которого непосредственно связан с мышечной активностью, способен участвовать в поддержании МПП скелетных мышечных волокон за счёт повышения электрогенной активности альфа2-изоформы Na,K-АТФазы и гиперполяризации мембраны. Эти новые факты могут быть полезными с точки зрения поиска путей коррекции мышечной дисфункции, в том числе на её ранних этапах, предшествующих развитию выраженной атрофии.

Работа поддержана грантом РФ № 18-15-00043.

Становление теории о неквантовом выделении нейромедиатора

Маломуж А.И.

Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Фундамент современных представлений о выделении сигнальных молекул из нервного окончания был заложен в работах Б. Катца на холинергическом нервно-мышечном синапсе ещё в 50-х годах XX века. Эти работы показали, что нейромедиатор выделяется порционно (квантами), и впоследствии позволили сформулировать так называемую «квантово-везикулярную теорию» нейросекреции, основной постулат которой гласит: один квант медиатора есть содержимое одной синаптической везикулы. При спонтанном или вызванном электрическим импульсом экзоцитозе синаптической везикулы в синаптическую щель выделяется относительно стабильная порция нейромедиатора. Изучая процессы нейросекреции в отсутствие стимуляции нерва, было установлено, что лишь незначительная часть ацетилхолина способна секретироваться в виде квантов, остальная же часть медиатора выделяется из нерва альтернативным, невезикулярным путём. Изначально было предположено, что это пассивный процесс, в связи с чем, в научный обиход вошёл термин «утечка медиатора».

В 1977 г. была разработана электрофизиологическая методика оценки неквантового выделения ацетилхолина, базирующаяся на регистрации степени гиперполяризации постсинаптической мембраны после блокады холинорецепторов в условиях ингибирования ацетилхолинэстеразы. Несмотря на ряд недостатков, данная методика прошла тщательную проверку временем и по настоящее время является одним из наиболее удобных электрофизиологических инструментов для оценки неквантового выделения ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе. Именно с помощью этой методики Е. Е. Никольским и его соавторами был получен основной массив экспериментальных данных, доказывающих, что неквантовый выход ацетилхолина из двигательного нервного окончания есть активный процесс, реализуемый определённым белком-переносчиком. На роль такого переносчика претендует либо собственно транспортный белок системы захвата холина высокого сродства, либо какой-то другой переносчик, функционально с ним ассоциированный. Исследования механизма неквантового выделения ацетилхолина показали, что этот процесс имеет уникальную зависимость от ионного состава окружающей среды, от температуры и содержания кислорода, отличную от процесса спонтанной квантовой секреции. Кроме того, было установлено, что неквантовое выделение ацетилхолина способно регулироваться (независимо от квантовой нейросекреции) целым спектром синаптически активных молекул, выступающих в нервно-мышечном синапсе в качестве ко-медиаторов ацетилхолина, модуляторов и ретроградных посредников (АТФ, глутамат, гамма-аминомасляная кислота, оксид азота, перекись водорода).

В ряде работ, проведённых как в нашей стране, так и за рубежом, были получены данные, свидетельствующие о значимой нейротрофической роли некантового выделения ацетилхолина. Так в частности, оказалось, что в процессе синаптогенеза и при реиннервации некантовая секреция является раньше, чем кантовое выделение, а нарушается этот механизм нейросекреции в первые часы при денервации, когда процесс кантового выделения всё ещё остаётся без изменений.

За последнее десятилетие различными группами исследователей было доказано, что ацетилхолин выделяется некантовым образом не только из двигательных нервных окончаний, но и из терминалей холинергических нейронов, иннервирующих как сердечную, так и гладкую мускулатуру. При этом, во всех этих случаях была подчеркнута ключевая роль именно системы захвата холина высокого сродства, а это, в свою очередь, предполагает универсальность механизма некантовой нейросекреции ацетилхолина во всех холинергических нейронах. В связи с этим необходимо отметить и следующий факт: к настоящему моменту наличие процесса некантового, невезикулярного выделения продемонстрировано и в отношении различных нейромедиаторов ЦНС (глутамата, глицина, дофамина, гамма-аминомасляной кислоты). При этом основная роль в механизме реализации данного вида нейросекреции опять-таки отводится системам обратного захвата медиатора.

Таким образом, в настоящее время некантовую форму выделения медиатора необходимо рассматривать как активный независимый механизм нейросекреции, выполняющий свою определённую сигнальную функцию в синаптическом контакте. Данный механизм нейротрансмиссии обладает многоконтурной системой регуляции и присущ не только холинергическим нейронам периферической нервной системы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-15-01279.

Cholinesterases: from structure to functions

Masson P.¹, Lushchekina S.²

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Moscow, Russia

Cholinesterases (ChEs), i.e., acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) are closely related serine hydrolases. Both enzymes have similar three-dimensional-structure. Though their catalytic mechanisms are similar, they display different substrate specificity and inhibitor sensitivity. This mostly reflects size differences in the active center gorge, structural differences in the allosteric peripheral anionic site, and difference in molecular dynamics.

Both enzymes are present in almost all tissues of vertebrates. In particular, in human, BChE is abundant in plasma. Unlike AChE that plays a key role in terminating the action of acetylcholine in central and peripheral cholinergic system, no direct involvement of BChE in cholinergic system has been demonstrated so far. However, BChE may be a surrogate or a backup for AChE in case of deficiency of this enzyme. In addition, both ChEs may have non-cholinergic and non-catalytic functions. Though BChE hydrolyzes ghrelin, the hunger hormone, no real physiological function has been assigned to this enzyme so far. However, the toxicological and pharmacological importance of human plasma BuChE has long been recognized. Indeed, BChE is involved in degradation of numerous ester-containing drugs (aspirin...) and poisons (heroin, cocaine) and conversion of prodrugs into pharmacologically active compounds. Deficit of BChE (genetic variants, depletion of active enzyme) may have dramatic consequence after injection of myorelaxants like succinylcholine.

AChE and BChE are covalently inhibited by carbamates and organophosphorus compounds (OPs). Inhibition of AChE by pesticide OPs and nerve agents causes a major cholinergic syndrome. Endogenous BChE as an OP scavenger protects AChE against low doses of toxicants. Thus, administration of exogenous BChE has proven to be safe and effective to protect AChE against multiple LD50 of OPs. Thus, BuChE-based biopharmaceuticals are under research and development as bioscavengers for stoichiometric neutralization and catalytic detoxification of OPs. AChE inhibition at neuromuscular junction is used for palliative treatment of *myasthenia gravis*. Finally, both enzymes are also the targets of ChE inhibitors used in the palliative treatment of the Alzheimer disease. However, after more than 20 years of use, the medical benefit of these drugs is disappointing. Thus, multitarget directed ligands (MTDL), disease-modifying compounds that also inhibit ChEs are promising.

Исследование нейротоксических эффектов пренатальной гипергомоцистеинемии

Ситдикова Г.Ф.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Гомоцистеин, тиолсодержащая аминокислота, является промежуточным продуктом метаболизма метионина. Содержание гомоцистеина в норме находится в диапазоне 5–15 мкмоль и может слегка увеличиваться с возрастом. Повышение уровня гомоцистеина более 15 мкмоль определяется как гипергомоцистеинемия (гГЦ). гГЦ может быть связана как с нарушениями диеты и образа жизни (увеличением метионина в рационе, дефицит витаминов (фолат, В12 или В6, курение, алкоголизм), так и мутациями ферментов метаболизма гомоцистеина. Так, гГЦ может быть вызвана мутациями гена, кодирующего метилен тетрафолат редуктазу, ограничивающую процесс метилирования, или гена, кодирующего фермент цистатионин бета-синтазу, ответственный за путь транссульфурации гомоцистеина, в котором также образуется сероводород (H_2S), представитель семейства газомедиаторов, обладающий нейропротекторными свойствами.

гГЦ приводит к эндотелиальной дисфункции и является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, патологий нервной системы, связанных с когнитивными нарушениями, повышенным риском болезни Альцгеймера, сосудистой деменции или цереброваскулярного инсульта. Повышенный уровень гомоцистеина во время беременности приводит к таким осложнениям как гипертензия, отслойка плаценты, тромбоэмболия, дефекты нервной трубки и задержка внутриутробного развития. У детей, рождённых от матерей с высокими уровнями гомоцистеина, наблюдается умственная и физическая отсталость. На животных моделях показано, что хроническое повышение гомоцистеина у самок вызывало окислительный стресс и апоптоз в мозге плода, что приводило к постнатальным нарушениям развития. Одной из известных мишеней гомоцистеина в нервной системе являются глутаматные НМДА рецепторы, гиперактивация которых может приводить к повышению возбудимости, увеличению уровня кальция в клетке и как следствие к апоптозу. Было показано, что гГЦ у пациентов с полиморфизмом гена 5,10-метилентетрагидрофолатом редуктазы (C677T), и дефицитом цистатион-бета-синтазы наблюдается высокий риск развития эпилепсии. При этом системное введение метаболитов гомоцистеина приводит к эпилептиформной активности в зависимости от возраста животного.

В нашей работе было проанализировано влияние пренатальной гГЦ на физические параметры, развитие сенсомоторных рефлексов, двигательное, исследовательское, эмоциональное поведение потомства. Было показано снижение размера выводка, массы тела, высокая смертность потомства от самок с гГЦ. Наблюдали задержку созревания ряда сенсомоторных рефлексов, снижение двигательного, исследовательского поведения, мышечной силы одновременно с повышением тревожности. Нами было показано повышение уровня оксидативного стресса в ткани мозга крыс с пренатальной

гГЦ, а также изменение активности антиоксидантных ферментов. Кроме того, в мозге животных с гГЦ наблюдалось снижение уровня свободных сульфидов (H_2S) и экспрессия фермента синтеза сероводорода – цистатионин бета синтазы. Введение донора сероводорода в течение 2 недель до и во время беременности крысам с гГЦ предотвращало смертность, задержку созревания рефлексов, поведенческие отклонения у потомства, а также развитие окислительного стресса, что указывает на его нейропротекторные эффекты.

На срезах гиппокампа новорожденных крысят в течение первой недели после рождения были проанализированы электрофизиологические свойства пирамидных нейронов гиппокампа и нейрональная сетевая активность. Оказалось, что гГЦ увеличивает возбудимость нейронов, что выражалось в снижении порога генерации потенциалов действия, а также не проявлялась частотная адаптация при генерации повторных потенциалов действия. В условиях внеклеточной регистрации анализировали внеклеточную активность и гигантские деполяризующие потенциалы (ГДП). У животных с пренатальной гГЦ наблюдалось снижение частоты ГДП и повышение частоты потенциалов действия. Кроме того, срезы гиппокампа крыс второй недели после рождения проявляли повышенную чувствительность к генерации эпилептиформной активности при действии 4-аминопиридина. Наконец, в экспериментах *in vivo* было выявлено, что крысята с пренатальной гГЦ более восприимчивы к флуротил-вызванным судорогам в поведенческом тесте. Регистрация ЭЭГ в гиппокампе показала, что базовая нейрональная активность выше у животных с пренатальной гГЦ, а подача флуротила приводит к более мощным по амплитуде эпилептическим разрядам, чем у контрольных животных.

Таким образом, материнская гГЦ приводит к нарушениям развития потомства, поведенческим нарушениям, оксидативному стрессу, что эффективно нивелируется введением донора сероводорода самкам во время беременности. При этом анализ нейрональной активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрировал повышенную возбудимость нейронов гиппокампа к действию про-конвульсантов, что может лежать в основе повышенный риск развития эпилепсии при гГЦ.

Работа поддержана грантом РФФ.

Homocysteinemia induces mechanical allodynia via PKC-dependent enhancement of Cav3.2 T-type channel surface expression

Weiss N.

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

Homocysteinemia is an independent risk factor for peripheral neuropathy. However, the cellular mechanisms underlying toxic effects of elevated levels of homocysteine on the processing of peripheral nociception have not yet been investigated comprehensively. Here, we report that elevated levels of homocysteine significantly enhance low-voltage-activated T-type calcium currents in dorsal root ganglion neurons. Mechanistically, our *in vitro* studies indicate that homocysteine enhances surface expression of Ca_v3.2 channels by promoting the recycling of the channel protein back to the plasma membrane via a PKC-dependent signaling pathway that requires the direct phosphorylation of Ca_v3.2 at specific loci. Finally, we demonstrate that *in vivo* pharmacological inhibition of Ca_v3.2 channels via intraplantar injection of T-type channel blockers reverses mechanical allodynia in a rat model of prenatal homocysteinemia. Altogether, these results reveal an unrecognized signaling pathway that modulates the expression of T-type calcium channels and provide experimental evidence that homocysteinemia is causally relevant to the development of peripheral neuropathy.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

Секция
«Передача возбуждения
в периферических синапсах»

Исследование изменения свойств серотониновых рецепторов командных нейронов виноградной улитки после обучения

Богодвид Т.Х.^{1,2}, Андрианов В.В.¹, Дерябина И.Б.¹, Муранова Л.Н.¹, Силантьева Д.И.¹, Гайнутдинов Х.Л.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия

Память можно определить как процесс, состоящий в запоминании, хранении и воспроизведении приобретенного опыта. Важным аспектом для процессов обучения является нейромодуляция, которая необходима для формирования долговременной памяти. Установлено, что серотонин (5-НТ) является основным медиатором, который опосредует оборонительное поведение у моллюсков и обучение на основе оборонительных рефлексов. В последнее время развивается концепция о том, что важнейшую роль в механизмах памяти у моллюсков играет объёмная (внесинаптическая) передача 5-НТ. У виноградной улитки – это модуляторные нейроны pedalного ганглия. Найдено, что аппликация 5-НТ вызывает эффекты, сходные с гетеросинаптическим облегчением, лежащим в основе обучения. Оно включает облегчение высвобождения медиатора из терминалей сенсорного нейрона, поэтому посредством аппликаций 5-НТ в омывающий центральную нервную систему раствор удаётся воспроизвести электрофизиологические корреляты пластичности. Показано, что антагонист 5-НТ рецепторов миансерин блокирует две формы оборонительного поведения *Lymnaea*, вызываемых безусловным стимулом (экстрактот ткани рака), а другой антагонист 5-НТ рецепторов, метилсергид, блокирует формирование долговременной памяти после обучения. 5-НТ, так же как и антагонист серотониновых рецепторов метиотепин, предотвращают посттетаническую потенциацию вызванного ацетилхолином входящего тока у улиток. На some премоторных интернейронов виноградной улитки, которые являются объектом нашего исследования, были найдены рецепторы 5-НТ первого типа (Пивоваров с сотрудниками, 2003–2014). Исходя из вышесказанного, целью данной работы было исследование изменения возбудимости командных нейронов в ответ на аппликацию серотонина.

Для экспериментов использовались наземные улитки *Helix lucorum*, нервная система которых хорошо описана. До экспериментов улиток не менее двух недель держали в активном состоянии в стеклянных террариумах во влажной атмосфере при комнатной температуре, при избытке пищи. В качестве подготовки к основной работе у половины улиток выработывали оборонительный условный рефлекс (ОУР) на постукивание по раковине. В качестве условного стимула служило постукивание по раковине (2 раза), которое в норме не вызывало оборонительной реакции у животного. В качестве безусловного стимула использовался дувок струи воздуха в отверстие легочной полости, что вызывало у животных безусловную оборонительную реакцию закрытия пневмостома. Сочетания стимулов предъявляли с интервалом 2–4 мин. Рефлекс выработывался

за три дня в результате предъявления около 150 сочетаний условного и безусловного рефлексов. Результатом такого обучения является полное закрытие пневмостома в ответ на условный стимул, что отмечалось как положительная реакция. Далее исследовали реакции командных нейронов на аппликацию (в течение 30 мин) 5-НТ в концентрации 4×10^{-4} моль/л в раствор, омывающий препарат интактных и обученных улиток. Регистрировали мембранный и пороговый потенциалы.

Результаты показали, что аппликации 5-НТ вызывает достоверное снижение мембранного потенциала командных нейронов, как интактных улиток, так и обученных улиток. Аппликация 5-НТ не вызывает каких-либо изменений порогового потенциала этих нейронов у интактных улиток. Однако в противоположность им аппликация 5-НТ на командные нейроны обученных улиток вызывает увеличение порогового потенциала. Отсюда, можно предположить, что влияние внеклеточного серотонина на состояние командных нейронов у улиток после обучения меняется. Уровень возбудимости этих нейронов снижается из-за повышения порогового потенциала под влиянием внеклеточного серотонина у обученных улиток, который может быть выброшен, например, из модуляторных 5-НТ-содержащих нейронов. Данный факт может иметь важное значение при анализе пластических изменений, происходящих в нервной системе при обучении.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

Экзоцитоз и эндоцитоз синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях в условиях нарушения функции септинов

Григорьев П.Н., Хисамиева Г.А., Зефилов А.Л.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Известно, цитоскелет сформирован различными элементами: актиновыми филаментами, тубулиновыми микротрубочками и др. и вовлечён в механизмы разнообразных клеточных процессов. Одним из элементов цитоскелета служат септины, которые, полимеризуясь, образуют филаменты, кольца, сети и другие структуры. Несмотря на обнаруженную экспрессию септинов в различных типах клеток, в том числе нейронах, роль септинов в механизмах выделения медиаторов остаётся недостаточно изученной и противоречивой. В экспериментах на двигательных нервных окончаниях нервно-мышечного препарата диафрагмы мышцы исследовались процессы секреции медиатора и экзо-эндоцитоза синаптических везикул в условиях нарушения работы септинов. Для стимуляции полимеризации септинов был использован форхлорфенурон (50 мкмоль), который добавлялся в перфузионный раствор за 40 мин до начала стимуляции секреции медиатора высокочастотным раздражением двигательного нерва. Регистрацию миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 моль KCl. Для исследования процессов экзоцитоза синаптических везикул был использован флуоресцентный краситель FM 1-43, свечение которого наблюдалось с помощью микроскопа Olympus BX51W1, оснащенного конфокальным сканирующим диском DSU. Для блокирования сокращений мышечных волокон использовался μ -котококсин G11В (1–2 мкмоль). Обнаружено, что экспозиция форхлорфенурана снижала частоту МПКП, а в условиях высокочастотного раздражения двигательного нерва приводила к углублению динамики депрессии ПКП. Раздражение нерва в присутствии флуоресцентного красителя FM 1-43 вызывало захват красителя процессами эндоцитоза синаптических везикул, что выражалось в увеличении интенсивности свечения двигательных нервных терминалей; на фоне действия форхлорфенурана загрузка FM 1-43 увеличивалась. Раздражение предварительно окрашенных FM 1-43 препаратов приводило к выгрузке красителя процессами экзоцитоза синаптических везикул и быстрому падению интенсивности свечения нервных терминалей; однако, в присутствии форхлорфенурана динамика падения свечения замедлялась. Полученные данные свидетельствуют о замедлении процессов рециклирования синаптических везикул при нарушении функции септинов в двигательных нервных окончаниях.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-04-01870-а.

Зависимость реконсолидации контекстуальной памяти у виноградной улитки от серотонина

Дерябина И.Б.¹, Муранова Л.Н.¹, Андрианов В.В.¹, Богодвид Т.Х.^{1,2}, Гайнутдинов Х.Л.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия

Воспоминание сохраненной памяти – это не просто повторное воспроизведение, а реконструкция, попытка заново пережить то, что когда-то было. То есть, каждый раз в момент воспоминания мы не только извлекаем информацию, а, возможно, создаём её заново, и для памяти – это динамический процесс, который либо усиливает, либо слегка изменяет её. Такой процесс повторной консолидации памяти при напоминании назвали реконсолидацией, которая также нуждается в белковом синтезе. Было показано, что может произойти амнезия памяти, если консолидированная и стабильная долговременная память (ДП) будет реактивирована перед амнестическим воздействием. Такой результат достигается как напоминанием, так и контекстуальным ознакомлением животного с обстановкой, а также воспоминанием, зависимым от его состояния. Без процедуры «напоминания» реактивация памяти не происходит. Контекстуально специфическое обучение и память о нем найдена также у беспозвоночных животных. Серотонин (5-НТ) является одним из широко распространенных и хорошо изученных медиаторов нервной системы. К настоящему времени накопился большой экспериментальный материал, свидетельствующий о связи функционирования серотонинергической системы со способностью к обучению. Большое количество экспериментов выполнены с использованием аппликации 5-НТ для получения клеточных аналогов обучения. В поведенческих экспериментах было показано, что разрушение функционирования серотонинергической системы нейротоксином не меняло первоначальную память, однако вело к нарушению памяти после повторной реактивации. Одним из веществ, разрушающих серотонинергическую систему, является р-хлорфенилаланин (р-ХФА), который угнетает триптофан гидроксилазу.

Поэтому нами было проведено исследование роли 5-НТ в контекстуальном обусловливании при формировании условного обстановочного рефлекса и его реконсолидации на фоне блокады синтеза 5-НТ блокатором его синтеза р-ХФА. Эксперименты проводились на наземном брюхоногом легочном моллюске *Helix lucorum* (Gastropoda, Pulmonata) крымской популяции. Перед началом экспериментов моллюски не менее 2-х недель находились в активном состоянии. У всех животных вырабатывали обстановочный условный рефлекс (ОУР) по контекстуальной парадигме «на шаре» в ситуации, когда животные были жёстко закреплены за раковину. При этом у них сохранялась свобода передвижения по поверхности шара, плавающего в воде, они полностью вытягивались из раковины. Обучение заключалось в предъявлении безусловного стимула (электрическое раздражение) при нахождении улитки в определённом контексте – на шаре. Животных каждый

день на протяжении 5 дней помещали в экспериментальную обстановку (на шар) и предъявляли по 5 электрических раздражений в день (1–2 мА, 1 с, 50 Гц) прикосновением двух макроэлектродов – к дорзальной передней части ноги и к хвосту. ОУР считался сформированным, если реакция на шаре значительно превышала таковую на плоской поверхности. На следующий день, после тестирования, подтверждающего обучение, улиток помещали на 20 мин на шар, что служило напоминанием, а затем блокировали биосинтез белка инъекцией анизомицина в дозе 0.4 мг на улитку. Для исследования роли 5-НТ в реконсолидации и её нарушении улиткам производили внутригемоцельную инъекцию р-ХФА в дозе 2 мг/г веса (растворенного в 0.1 мл солевого раствора для улитки – ФР) за 3 дня до напоминания обстановки. Было продемонстрировано достоверное возрастание оборонительных реакций, когда виноградная улитка находится на шаре (в 5–7 раз, $p < 0.001$), в то же время число оборонительных реакций при тестировании на плоской поверхности достоверно не увеличивается, что демонстрирует обучение. Эти результаты предполагают появление контекстуально-зависимой памяти. На следующий день после тестирования, проводили сеанс «напоминания», а затем сразу блокировали биосинтез белка инъекцией анизомицина, а контрольным улиткам вводился ФР. Было показано, что забывания памяти на ОУР при напоминании и одновременного ингибирования синтеза белка не происходит, если в нервной системе нарушена серотониновая передача. Данный эффект существенно отличается от прямого действия анизомицина, который блокирует реконсолидацию контекстуальной памяти. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости 5-НТ для процесса реконсолидации памяти на примере виноградной улитки.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

Влияние мускариновых рецепторов на процесс входа кальция в моторные окончания мышцы

Жиляков Н.В., Архипов А.Ю., Самигуллин Д.В.

Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

В настоящее время известно, что в периферическом синапсе позвоночных животных существует 4 типа метаботропных мускариновых рецепторов M1–M4. Исследования показывают, что данные типы рецепторов могут изменять параметры выброса нейромедиатора, например, активация M1 типа рецепторов приводит к облегчению освобождения медиатора, а активация M2 наоборот, угнетает её (Santafe et al., 2003). Известно, что выброс нейромедиатора инициируется входом кальция в нервное окончание. В настоящем исследовании мы изучали, как активация мускариновых рецепторов может влиять на вход ионов кальция в нервное окончание мышцы, а также через какие типы этих рецепторов может быть опосредован этот процесс.

Исследование проводили на изолированном нервно-мышечном препарате *m. levator auris longus* (мышь). Для того чтобы оценить квантовый состав мы применяли внутриклеточную микроэлектродную технику для регистрации спонтанных и вызванных потенциалов концевых пластинок. Оценка квантового состава производилась путём деления амплитуд вызванных сигналов на амплитуду миниатюрных. Измерения кальциевого транзientа (изменение свечения флуоресцентного кальциевого красителя вследствие его связывания с ионами кальция) проводились при помощи высокоскоростной камеры Neuro CCD SMQ (Redshirt Imaging). Через культуру нерва загружали нервные терминалы высокоаффинным флуоресцентным кальций-чувствительным красителем Oregon Green 488 BAPTA-1 hexapotassium salt. (Samigullin et al., 2017).

В результате проведённого исследования выяснилось, что активация мускариновых рецепторов влияет на процесс выброса нейромедиатора. Аппликации мускарина в концентрации 10 мкмоль приводит к достоверному снижению входа кальция в пресинаптическую клетку на $21 \pm 4.5\%$ ($p < 0.05$, $n = 8$) и снижению квантового состава вызванных потенциалов концевой пластинки с 36.31 квантов до 34.72 ($4.7 \pm 1.1\%$) ($p < 0.05$, $n = 7$). Блокада всех типов мускариновых рецепторов при помощи атропина 1 мкмоль и 10 мкмоль приводила к увеличению амплитуды кальциевого транзientа на $12.7 \pm 3\%$ ($p < 0.05$, $n = 8$) и $19.6 \pm 4.6\%$ ($p < 0.05$, $n = 8$) соответственно. Чтобы выяснить вклад отдельных типов метаботропных мускариновых холинорецепторов, мы провели серию экспериментов с поочередной блокадой M1 и M2 типов рецепторов и последующей аппликацией мускарина. Согласно полученным данным, блокада M1 типа рецепторов при помощи пирензипина 10 мкмоль и применение блокатора M2 типа рецепторов, метакрамина 10 мкмоль, вызывало увеличение входа кальция в пресинаптическую клетку на $16.3 \pm 3.3\%$ ($p < 0.05$, $n = 8$) и $19 \pm 3.9\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$) соответственно, а действие мускарина, в присутствии этих агентов

полностью снималось. Из полученных нами данных, а также опираясь на данные полученные другими исследователями (Santafe, 2005), можно сделать вывод о том, что мускариновая регуляция нейротрансмиссии, осуществляется за счёт изменения входа ионов кальция в моторное нервное окончание, путём активации M1 и M2 типов мускариновых рецепторов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00490.

Оксисленные формы холестерина как модуляторы экзоцитоза в нервно-мышечном синапсе мышцы

Закирьянова Г.Ф.^{1,2}, Петров А.М.^{1,2}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

² Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Двигательная активность зависит от многих факторов и влияет на качество жизни. На данный момент исследуется роль холестерина и его окисленных форм в синаптической передаче. Холестерин в большом количестве содержится в липидной мембране, может регулировать различные процессы, модулировать везикулярный цикл (Krivoi, Petrov, 2019). В течение жизни и при нейродегенеративных заболеваниях холестерин окисляется, и его дериваты по-разному модулируют нейротрансмиссию (Kasimov et al., 2017; Mukhutdinova et al., 2019). В данной работе проводится сравнение эффектов двух окисленных форм холестерина на процесс экзоцитоза.

25-гидроксихолестерин (25ГХ) образуется с участием фермента 25-гидроксилазы и имеет множество эффектов: участие в метаболизме липидов, воспалении и иммунном ответ. Он является лигандом для ядерного транскрипционного фактора LXR (Diczfalusy, 2013). К тому же, может модулировать работу NMDA-рецепторов, усиливая выживаемость в культуре нейронов (Sun et al., 2017). Другой окисленный дериват – олесоксим (4-холестан-3-он, оксим), получен синтетическим способом во время скрининга веществ, обладающих нейропротекторными свойствами (Bordet, 2007). В некоторых работах его эффект связывают с блокированием митохондриальной поры, формируемой при участии VDAC (потенциал-зависимый анионный канал). VDAC экспрессируется не только в митохондриях, но и на плазматической мембране и в синаптических везикулах. В дополнение олесоксим снижает текучесть мембран митохондрий, препятствуя образованию митохондриальной поры. Механизм действия обоих оксистеринов на синаптическую передачу изучены недостаточно.

Эксперименты проводились на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы мышцы. Эффекты олесоксима (0.2 мкмоль, 15 мин аппликация) и 25ГХ (1 мкмоль, 20 мин) исследовали с использованием оптического метода. Для оценки динамики экзоцитоза применяли краситель FM1-43, который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и в ходе эндоцитоза (3 мин, 20 Гц) загружается внутрь синаптических везикул. Для оценки динамики экзоцитоза нервно-мышечный препарат подвергался стимуляции 20 Гц в течение 10 мин. Оказалось, что 25ГХ усиливал выброс везикул, содержащих FM-краситель. Однако олесоксим наоборот снижал скорость данного процесса. В целях выяснения механизмов действия данных оксистеринов, использовали блокаторы. В случае 25ГХ, блокировали кальций-зависимую протеинкиназу С (50 мкмоль). Оказалось, что эффект 25ГХ снимается при блокировании протеинкиназы С. Поскольку по литературным данным олесоксим может воздействовать

на VDAC, мы решили использовать мембранонепроницающий блокатор S18 (1 мкмоль, S18 phosphorothioate randomer oligonucleotide). Нами были получены данные, что эффект олесоксима на экзоцитоз значительно подавлялся при ингибировании VDAC.

Таким образом, две различные формы холестерина имеют разнонаправленный эффект на выгрузку красителя FM1-43. Вероятно, механизм действия, в случае 25ГХ, зависит от протеинкиназы С, олесоксима – от VDAC.

Работа поддержана РФФИ (грант № 17-04-00046).

Литература

1. Krivoi I.I., Petrov A.M.: Cholesterol and the safety factor for neuromuscular transmission // *Int. J. Mol. Sci.* 2019, vol.28, no.20(5).
2. Kasimov M.R., Fatkhrahmanova M.R., Mukhutdinova K.A., Petrov A.M.: 24S-Hydroxycholesterol enhances synaptic vesicle cycling in the mouse neuromuscular junction: Implication of glutamate NMDA receptors and nitric oxide // *Neuropharmacology*. vol.117, pp.61–73.
3. Diczfalusy U.: On the formation and possible biological role of 25-hydroxycholesterol // *Biochimie*. 2013, vol.95, no.3, pp.455–460.
4. Sun M.Y., Taylor A., Zorumski C.F., Mennerick S.: 24S-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol differentially impact hippocampal neuronal survival following oxygen-glucose deprivation // *PLoS One*. 2017, vol.12, no.3: e0174416.
5. Bordet T., Buisson B., Michaud M., Drouot C., Galéa P., Delaage P., Akentieva N.P., Evers A.S., Covey D.F., Ostuni M.A., Lacapère J.J., Massaad C., Schumacher M., Steidl E.M., Maux D., Delaage M., Henderson C.E., Pruss R.M.: Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007, vol.322, no.2, pp.709–720.
6. Mukhutdinova K.A., Kasimov M.R., Zakyrganova G.F., Gumerova M.R., Petrov A.M.: Oxysterol modulates neurotransmission via liver-X receptor/NO synthase-dependent pathway at the mouse neuromuscular junctions // *Neuropharmacology*. 2019, vol.18, no.150, pp.70–79.

Участие KCNQ-каналов в регуляции вызванной секреции ацетилхолина из двигательных нервных окончаний лягушки и мышцы

Ковязина И.В., Ценцевицкий А.Н., Хузахметова В.Ф.

Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Потенциал-активируемые калиевые каналы подсемейства Kv7 (KCNQ) участвуют в регуляции возбудимости нейронов и других возбудимых клеток. Активность KCNQ-каналов регулируется различными нейромедиаторами, в том числе – ацетилхолином. Различные подтипы этих калиевых каналов широко представлены в ЦНС, сердце, а также гладких и скелетных мышцах. Однако к настоящему времени практически ничего не известно об участии KCNQ-каналов в регуляции функций нервно-мышечных синапсов.

Целью данного исследования было изучить влияние активации и блокады KCNQ-каналов на параметры нервно-мышечной передачи возбуждения в моторных синапсах лягушки и мышцы. Эксперименты проводились на изолированных препаратах кожно-грудинной и портняжной мышц лягушки (*R. ridibunda*) и диафрагмальной мышце мыши (линия BALB/c). Использовалась стандартная микроэлектродная техника внутриклеточного и экстраклеточного отведения потенциалов и токов концевой пластинки (ПКП и ТКП) в среде с физиологическим и сниженным уровнем ионов кальция.

Эксперименты показали, что в синапсах лягушки в условиях сниженного уровня ионов кальция (0.3 ммоль) и активатор ретигабин (10 мкмоль), и блокатор XE-991 (10 мкмоль) уменьшали квантовый выброс ацетилхолина. В синапсах мыши открывание и блокада KCNQ-каналов не приводили к достоверным изменениям интенсивности нейросекреции. Однако блокатор KCNQ-каналов (XE-991) увеличивал минимальную синаптическую задержку между потенциалом действия нервного окончания и началом постсинаптического ответа, и этот эффект наблюдался в синапсах холоднокровных и теплокровных животных.

Высокочастотная стимуляция двигательного нерва (10, 100 имп/с) в присутствии XE-991 в условиях физиологического уровня ионов кальция в среде приводила к более выраженной синаптической депрессии по сравнению с контрольными препаратами.

Таким образом, потенциал-активируемые калиевые каналы подсемейства Kv7 участвуют в регуляции синаптической передачи в нервно-мышечных контактах позвоночных, но есть различие в эффектах модуляторов этих каналов в синапсах животных разных классов.

Поддержано грантом РФФИ № 17-04-690.

Влияет ли аллостерический модулятор катионного нАХР $\alpha 7$ -типа PNU-120596 на анион-проводящие рецепторы?

Лебедев Д.С.¹, Вульфийус Е.А.², Крюкова Е.В.¹, Цетлин В.И.¹

¹ Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Институт биофизики клетки, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

Одной из причин нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера, шизофрении и др.) предположительно является дисфункция $\alpha 7$ никотиновых холинорецепторов (нХР) в областях мозга, участвующих в обучении и памяти. Применение положительных аллостерических модуляторов (ПАМ), усиливающих возбуждение $\alpha 7$ нХР, является заманчивым путём преодоления заболевания. Показано, что ПАМ 1-(5-хлор-2,4-диметоксифенил)-3-(5-метилизоксазол)-мочевина (PNU-120596, дальше PNU) в несколько раз увеличивает ток и/или вход ионов Ca^{2+} , вызванные возбуждением рекомбинантных $\alpha 7$ нХР и замедляет десенситизацию, но не влияет на гетеромерные нХР. Для использования производных PNU в качестве лекарства необходимо знать их влияние на другие ионотропные рецепторы. В настоящей работе мы исследовали действие PNU на рецепторы ГАМК типа А и рецепторы глицина человека, экспрессированные в ооцитах *Xenopus* и в клетках линии РС-12, а также на анион-проводящие нХР и рецепторы ГАМК и глутамата в идентифицированных нейронах моллюска *Lymnaea stagnalis*. Опыты проведены разными вариантами метода регистрации тока при фиксации мембранного потенциала. Во всех опытах применяли предварительную инкубацию клеток в растворе PNU, а затем апплицировали агонист вместе с PNU в той же концентрации.

Характеристики ответов ГАМК-рецепторов состава $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ на ГАМК + PNU (амплитуда пикового тока и десенситизация) заметно не изменялись ($n = 5$). В опытах на рекомбинантных рецепторах глицина мы обнаружили большой разброс: часть клеток (30%) не реагировала на PNU, но значительная часть отвечала увеличением тока, вызванного глицином. В среднем это увеличение составило $50 \pm 17.9\%$ ($n = 6$).

Идентифицированные нейроны *L. stagnalis* содержат два подтипа нХР, различающихся по кинетике десенситизации и относительной чувствительности к избирательным лигандам $\alpha 7$ нХР. Независимо от преобладания в нейроне того или другого подтипа нХР, PNU снижал амплитуду тока, вызванного ацетилхолином или цитизином. На клетках с быстрой десенситизацией и высокой чувствительностью к α -конотоксину ImI и цитизину (характерные признаки $\alpha 7$ -подобных нХР) этот эффект был почти в 2 раза сильнее ($34 \pm 4\%$), кроме того PNU в 3 раза ускорял начальную фазу затухания тока ($n = 14$); таким образом эффект был прямо противоположен действию на $\alpha 7$ нХР позвоночных. Ингибирующее действие PNU обнаружено также на ГАМК-рецепторы в нейронах *L. stagnalis*: уменьшение тока на $36 \pm 1\%$ и небольшое замедление десенситизации ($n = 7$). В предварительных опытах

с нейронами, содержащими анион-проводящие рецепторы глутамата, PNU также снижал амплитуду тока ($36 \pm 8\%$) и немного замедлял затухание ($n = 4$). Следует отметить, что небольшое замедление десенситизации ГАМК и Глу-рецепторов, возможно обусловлено уменьшением количества активированных каналов.

Ранее были идентифицированы 12 генов, кодирующих нХР в нейронах *L. stagnalis*; на основе нуклеотидной последовательности и экспрессии в ооцитах было установлено, что продукты экспрессии двух из них – субъединицы В и I – формируют анион-селективный канал. Используя известную ЯМР-структуру трансмембранного домена (ТМ) $\alpha 7$ нХР человека, мы построили гомологичную модель ТМ нХР типа В из *L. stagnalis* и методом молекулярного докинга смоделировали возможные сайты связывания PNU в $\alpha 7$ и в гомоолигомерном нХР, построенном из субъединиц В. Докинг показал, что возможный сайт посадки лиганда находится в межспиральной полости в верхней части ТМ, так же как в ТМ $\alpha 7$ нХР, но несколько отличается по ориентации молекулы PNU. Кроме того, результаты докинга позволяют предположить вклад остатков CYS17 и THR24 спирали ТМ1 в связывание PNU. Противоположный эффект PNU на $\alpha 7$ нХР человека и анион-проводящий нХР *L. stagnalis*, возможно, объясняется или некоторыми отличиями расположения молекулы PNU в ТМ или различием конформационных изменений, вызванных образованием комплекса с PNU. Интересно, что другие анион-проводящие лиганд-управляемые каналы: ГАМКА- и глициновые рецепторы человека, а также рецепторы ГАМК и глутамата *L. stagnalis* сильно отличались по знаку реакции на PNU и по влиянию на десенситизацию. Существенно, что в некоторых случаях следует иметь в виду побочное действие PNU-120596 на тормозные анион-селективные рецепторы человека.

Молекулярное моделирование реакций холинэстераз

Лущекина С.В., Массон П., Махаева Г.Ф., Петров К.А., Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Варфоломеев С.Д.

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Работы по компьютерному моделированию в области биохимии, биофизики и фармакологии холинэстераз непосредственно связаны с разработкой лекарственных препаратов для терапии болезни Альцгеймера, миастенических синдромов и отравлений нервными ядами и проводятся с использованием основных современных методов молекулярного моделирования: молекулярный докинг, молекулярная динамика, квантовая механика и комбинированный метод квантовой и молекулярной механики КМ/ММ. В докладе рассматривается весь диапазон механизмов взаимодействий холинэстераз с субстратами и ингибиторами на примере существующих и потенциальных лекарственных препаратов, природными субстратами и токсикантами: (1) исследования механизмов нековалентного ингибирования холинэстераз для разработки препаратов для паллиативной терапии болезни Альцгеймера, улучшающей когнитивные способности пациентов; (2) исследования роли ацетилхолинэстеразы в агрегации амилоидного пептида и развитии болезни Альцгеймера для разработки лекарственной терапии, замедляющей развитие нейродегенеративных процессов; (3) исследование механизмов сложной кинетики ингибирования медленного связыванию для разработки высокоэффективных препаратов для терапии миастенических синдромов со сниженными побочными эффектами; (4) исследования генетического полиморфизма холинэстераз – влияния единичных замен в гене ферментов бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы на их каталитическую активность, в первую очередь, в отношении лекарственных препаратов для разработки подходов и методов персонафицированной медицины; (5) исследования механизмов реакций, протекающих в активных центрах холинэстераз: ферментативный гидролиз субстратов, ингибирование фосфорорганическими соединениями и последующие реакции старения фосфорилированного фермента и его возможной реактивации показывают возможные направления разработки т.н. «каталитических биоловущек» на основе бутирилхолинэстеразы – модификаций фермента, способных к спонтанной реактивации с достаточно высокой скоростью для защиты организма от воздействия фосфорорганических отравляющих веществ.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-03-00043.

P2X7-рецепторы осуществляют кальций-зависимую регуляцию нервно-мышечной передачи у мышей, нокаутных по гену паннексина 1

Митева А.С., Молчанова А.И., Гайдуков А.Е., Балезина О.П.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

P2X7-рецепторы при активации образуют канал, пропускающий кальций. В ЦНС их активация при связывании с АТФ регулирует выброс медиатора как за счёт непосредственного увеличения концентрации кальция, так и за счёт активации внутриклеточных сигнальных каскадов. В моторной терминали P2X7-рецепторы присутствуют, и их активация вызывает усиление вызванного многоквантового выброса ацетилхолина (АХ), но конкретные механизмы их воздействия на секрецию АХ исследованы недостаточно. Поэтому в данной работе мы исследовали P2X7-рецепторы как непосредственный источник кальция, и как начальный этап активации внутриклеточного кальций-зависимого каскада.

Работа проводилась на мышах, нокаутных по гену паннексина 1, т.к. в условиях сниженной эффективной концентрации пуринов в синаптической щели экзогенная активация P2X7-рецепторов проявляется наиболее значительно. При помощи стандартной микроэлектродной техники регистрировали миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и потенциалы концевой пластинки (ПКП). На основе зарегистрированных данных рассчитывали квантовый состав вызванного выброса. Сравнения проводили при помощи критерия Стьюдента и двухфакторного дисперсионного анализа.

В первой части работы исследовали возможную роль сигнальных каскадов, запускаемых при помощи кальция, входящего по P2X7-рецепторам. Наиболее вероятной в этом случае является активация кальций-кальмодулинкиназного каскада. Блокаторы кальмодулина (W-7, 10 мкмоль) и кальмодулинкиназы II типа (KN-93, 3 мкмоль) предотвращали прирост квантового состава ПКП, при последующей аппликации агониста P2X7-рецепторов – VzATP (30 мкмоль). Это результаты подтверждают, что кальций, входящий через P2X7-рецепторы усиливает секрецию медиатора за счёт последовательной активации кальмодулина и кальмодулинкиназы II. Возможной мишенью действия кальмодулинкиназы II являются кальциевые каналы L-типа, которые в норме находятся в неактивном состоянии, но при срабатывании усиливают многоквантовую секрецию АХ. Блокатор кальциевых каналов – нитрендипин (1 мкмоль), предварительно апплицированный на препарат, полностью предотвращает прирост квантового состава ПКП, при последующей аппликации VzATP. Таким образом кальциевые каналы L-типа действительно являются мишенью для реализации потенцирующего эффекта активации сигнального каскада, запускаемого при срабатывании P2X7-рецепторов.

Во второй части работы рассматривали P2X7-рецепторы, как непосредственный источник кальция. Для этого нервную терминаль предварительно

но нагружали раствором мембран-проницаемого буфера ВАРТА-АМ (50 мкмоль) в течении 60 минут, далее отмывали сначала в бескальциевом, а потом в нормкальциевом растворе по 15 минут и затем регистрировали активность синапса. Оказалось, что предварительная аппликация ВАРТА-АМ значительно снижает квантовый состав ПКП на 30–45%, а последующее нанесение агониста P2X7-рецепторов VzАТР (30 мкмоль) возвращает значения квантового состава ПКП у контрольным. ВАРТА является «быстрым» буфером, способным предотвращать приток кальция от P/Q и других кальциевых каналов к комплексу белков, обеспечивающих экзоцитоз. Именно с функциональным разобщением внутри активных зон связано уменьшение вызванного выброса. Мы предполагаем, что вход кальция по каналам P2X7-рецепторов обеспечивает уменьшение буферной емкости ВАРТА, тем самым восстанавливая функциональную связь между кальцием, поступающим по P/Q-типу каналов и кальций-зависимыми белками экзоцитоза. При этом не происходит увеличение выброса по сравнению с контрольным, т.к. поступившего по каналам P2X7-рецепторов кальция оказывается недостаточно для дополнительного увеличения выброса медиатора.

Таким образом в данной работе продемонстрировано участие P2X7-рецепторов в регуляции кальциевого баланса клетки двумя способами. Во-первых, P2X7-рецепторы являются каналами для кальция, чья работа может самостоятельно поддерживать баланс кальция при снижении его концентрации, а во-вторых, P2X7-рецепторы активируют сигнальные каскады, приводящие к растормаживанию кальциевых каналов L-типа и усилению секреции медиатора.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00189.

Изменение секреции медиатора в двигательном нервном окончании теплокровных и холоднокровных животных при закислении внутриклеточной среды

Мухамедзянов Р.Д., Захаров А.В., Зефиоров А.Л.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

В опытах на диафрагме мыши и кожно-грудинной мышце лягушки с использованием электрофизиологического (регистрация потенциалов концевой пластинки – ПКП) и флуоресцентного (загрузка красителя FM-1-43) методов, исследовали эффекты закисления цитоплазмы нервных окончаний (НО) на секрецию медиатора, эндоцитоз и рециклирование синаптических везикул. Для блокирования сокращений и потенциалов действия мышечных волокон использовали тубокурарин в концентрации $(2-5) \times 10^{-6}$ моль/л. Уменьшение pH достигали замещением 50% NaCl во внеклеточном растворе на пропионат Na. Известно, что анионы слабых кислот, такие как пропионовая кислота, закисляют внутреннюю среду клеток (Sharp and Thomas, 1981). Хотя мембрана для внутриклеточных анионов относительно непроницаема, слабые кислоты, с которыми они находятся в равновесии, легко проникают через клеточные мембраны внутрь клетки. По мере того как слабые кислоты поступают в клетку, они диссоциируют и выпускают свободные ионы водорода, уменьшая внутриклеточный pH. Эксперименты начинали после выдерживания препаратов в таких растворах в течении 60 мин. В электрофизиологических экспериментах, для регистрации потенциалов концевой пластинки (ПКП) использовали внутриклеточное отведение. Раздражение двигательного нерва осуществляли серией импульсов с частотой 20 имп/с в течение 3 мин, затем при стимуляции с частотой 0.3 Гц наблюдали восстановление амплитуды ПКП. Для оценки эффективности эндоцитоза, краситель FM-1-43 загружали стимулируя двигательный нерв с частотой 20 Гц в течении такого времени, которое приводило к экзцитозу одинакового количества синаптических везикул в норме при ацидификации внутриклеточной среды НО. Для определения времени стимуляции проводили анализ кумулятивных кривых динамики квантового состава полученных при электрофизиологических методах исследования.

Оказалось, что закисление цитоплазмы приводит к изменению динамики секреции медиатора как в синапсах мыши, так и лягушки. У мыши наблюдалось более выраженная депрессия квантового состава ПКП по сравнению с контролем. В синапсах лягушки, наблюдалась первоначально более глубокая депрессия квантового состава ПКП, однако затем возникла стабилизация и даже некоторое повышение квантового состава ПКП в течении 50–60 с ритмического раздражения (т.н. удлинение «фазы плато» на кривой динамики секреции медиатора), и далее плавная депрессия квантового состава ПКП.

При флуоресцентных исследованиях было показано, что при действии пропионата натрия, наблюдается более высокая интенсивность свечения

по сравнению с контролем в НО мыши, в то время как в НО лягушки, закисление цитоплазмы не приводило к изменению свечения.

Выдвинута гипотеза, что закисление цитоплазмы НО оказывает влияние на скорость мобилизации синаптических везикул, скорее всего, происходит снижение скорости доставки синаптических везикул из «мобилизационного» и «резервного» пулов к активной зоне НО, т.е. в «пул готовый к освобождению». Так же вероятно, что снижение внутриклеточного рН влияет на процессы прайминга и докирования синаптических везикул.

Нифлумовая кислота – блокатор хлор-проницаемых рецептор-активируемых цис-петельных каналов

Пономарева Д.Н.¹, Петухова Е.О.¹, Михайлова Н.В.¹,
Брежестовский П.Д.^{1,2}

¹ Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Институт системных нейронаук, Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция

Нифлумовая кислота (НК) является фармакологическим препаратом, относящимся к классу нестероидных противовоспалительных средств. Однако последние исследования показывают, что НК является также блокатором некоторых типов хлор-селективных каналов: потенциал зависимых и кальций-активируемых хлорных каналов, ионотропных глициновых и ГАМК рецепторов. НК оказывает двухфазное действие (потенциацию и ингибирование) на $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ГАМК рецепторы. Направленность и выраженность эффектов НК зависит от её концентрации, типа рецепторов и от их субъединичного состава.

В настоящем исследовании мы сосредоточили внимание на глициновых (Гли-Р) и ГАМК $\rho 1$ и $\rho 2$ рецепторах, которые являются представителями цис-петельных рецепторов и аналогичны по своей структуре. Транс-мембранные (ТМ) домены этих рецепторов имеют высокую гомологию по аминокислотным последовательностям: в частности, ионопроводящие поры гомомерных Гли-Р $\alpha 1$, $\alpha 2$ и ГАМК $\rho 1$, $\rho 2$ рецепторов, образованные ТМ2 спиралями, имеют очень близкое строение. Подробное описание механизмов действия НК на Гли-Р было проведено Малеевой с соавторами в работе 2017 г. «Voltage-dependent inhibition of glycine receptor channels by niflumic acid». Работа выполнена на линиях клеток, экспрессирующих различные субъединицы Гли-Р. Авторы показали, что НК проявляет себя в отношении Гли-Р как каналоблокатор. При этом рецепторы, содержащие $\alpha 2$ субъединицы, имеют большее сродство к НК, чем рецепторы, содержащие $\alpha 1$ субъединицы. Субъединица β , необходимая для постсинаптической кластеризации Гли-Р, не оказывает существенного влияния на связывание НК.

В данном исследовании мы проанализировали влияние НК на Гли-Р мотонейронов гипоглоссального ядра мыши. Поскольку состав Гли-Р в нервной системе грызунов меняется в раннем постнатальном периоде развития (уровень экспрессии $\alpha 2$ субъединиц снижается и возрастает экспрессия $\alpha 1$ субъединиц), работа была проведена на двух возрастных группах мышей: 2–4 дня после рождения и 7–12 дней. Регистрацию ионных токов выполняли методом patch-clamp в конфигурации whole-cell при удерживаемом потенциале (V_{hold}) +30 мВ и –70 мВ. Анализировали амплитуду и частоту глицинергических спонтанных постсинаптических токов (сПСТ) и амплитуду глицинергических вызванных постсинаптических токов (вПСТ) в контроле и под действием НК (100 мкмоль). Для блокирования ГАМК-эргических и глутаматергических синаптических токов использовали антагонисты: 20 мкмоль бикуккуллин и 10 мкмоль CNQX. Ингибирующее действие НК на глициновые рецепторы было более выражено в младшей

группе. Амплитуда и частота сПСТ в младшей группе ($n = 9$) уменьшалась относительно контроля на $37.1 \pm 3.4\%$ ($p \leq 0.05$) и $78.0 \pm 4.8\%$ ($p \leq 0.05$), а в старшей ($n = 7$) – на $23.2 \pm 6.8\%$ ($p \leq 0.05$) и $35.6 \pm 18.6\%$ ($p \leq 0.05$), соответственно ($V_{\text{hold}} = -70$ мВ). Блокирующая активность НК при $V_{\text{hold}} = +30$ мВ была существенно выше, чем при $V_{\text{hold}} = -70$ мВ: в младшей группе амплитуда вПСТ снизилась на $62.2 \pm 7.4\%$ при $V_{\text{hold}} = +30$ мВ и на $37.4 \pm 4.8\%$ при $V_{\text{hold}} = -70$ мВ ($n = 4$), в старшей группе – на $32.8 \pm 3.1\%$ и $24.1 \pm 2.5\%$, соответственно ($n = 5$).

Эксперименты по оценке влияния НК на гомомерные ГАМК $\rho 1$ и $\rho 2$ рецепторы проводили на культивируемых клетках яичника китайского хомячка. Трансфекцию выполняли в соответствии с протоколом Lipofectamine 3000M (Life Technology, США). Ионные токи регистрировали методом patch-clamp в конфигурации whole-cell при $V_{\text{hold}} = -30$ мВ и $V_{\text{hold}} = +30$ мВ, и в режиме “ramp protocol” (при постепенном изменении напряжения от -60 мВ до $+60$ мВ). Влияние НК на ГАМК-индуцированные токи, опосредованные $\rho 1$ рецепторами, было очень слабым: добавление 100 мкмоль НК приводило к снижению амплитуды на $6.3 \pm 0.9\%$ ($n = 3$). Действие 300 мкмоль НК было также слабым: амплитуда падала в среднем на $15.8 \pm 1.9\%$ ($n = 3$). ГАМК-рецепторы, образованные субъединицами $\rho 2$, были гораздо более чувствительны к НК: амплитуда токов снижалась на $18.3 \pm 3.4\%$, $23.9 \pm 3.4\%$ и $42.2 \pm 4.6\%$ при концентрациях 30 мкмоль, 100 мкмоль и 300 мкмоль НК соответственно ($n = 6$). Вольт-амперная кривая, характеризующая токи утечки при разных удерживаемых потенциалах, в присутствии ГАМК была близка к линейной функции. Добавление НК вызывало уменьшение ГАМК-активируемых токов с более сильным ингибированием в области положительных потенциалов. В частности, степень ингибирования при -30 мВ составила $40.9 \pm 1.5\%$, при $+30$ мВ – $57.5 \pm 2.3\%$ ($n = 4$).

Таким образом, ГАМК $\rho 1$ рецепторы имеют чрезвычайно низкую чувствительность к НК, в то время как рецепторы ГАМК $\rho 2$ на порядок более высокую. Аналогичная разница наблюдается для $\alpha 1\beta$ и $\alpha 2\beta$ постсинаптических Гли-Р. Степень сродства НК к данным рецепторам варьирует в зависимости от удерживаемого потенциала, что является характерной особенностью каналоблокаторов. Поскольку сайты связывания для каналоблокаторов находятся глубоко в поре и ТМ2 этих рецепторов различаются по структуре только на уровне 2' и 12', то можно предположить ключевую роль 2' уровня ТМ2 спирали в определении чувствительности к НК.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-15-00313.

Активация NMDA-рецепторов в нервно-мышечном синапсе как механизм модуляции мембранного потенциала покоя мышечной клетки

Проскураина С.Е.^{1,2}, Петров К.А.^{1,2}

¹ Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Нарушение работы или недостаточный уровень экспрессии глутаматных NMDA рецепторов лежат в основе многих патологий работы головного мозга. Поскольку функционирование рецепторов глутамата данного типа в ЦНС влияет на процессы нейронального возбуждения, синаптической пластичности, эксайтотоксичности при нейродегенеративных расстройствах, а также может приводить к развитию эпилепсии и судорог, эти рецепторы активно рассматриваются в качестве мишени для многих нейроактивных фармакологических препаратов. Однако, функция периферических NMDA-рецепторов, в отличие от центральных, остаётся актуальным вопросом для исследования.

NMDAR представляют собой ионотропные лигандактивируемые рецепторы, для активации которых необходимы два условия: наличие агонистов – глутамата и глицина, а также устранение иона магния, который в покое блокирует пору канала. Показано, что магниевую блокаду можно снять с помощью деполяризации в естественных условиях, либо применением безмагниевого раствора Рингера.

В исследовании Malomouzh с соавт. (2011) показано, что облигатная субъединица NMDAR NR1 локализована на постсинаптической мембране нервно-мышечного синапса. Так как NMDA-рецептор представляет собой ионный канал, проницаемый для катионов, можно предположить, что активация функциональных NMDA-рецепторов, представленных на постсинаптической мембране, вызовет входящий ток катионов, следовательно, приведёт к деполяризации мембраны клетки. Однако при мембранном потенциале покоя показано наличие магниевых блока NMDA-рецепторов, который снимается деполяризацией мембраны или, в экспериментальных условиях, использованием безмагниевого раствора.

В безмагневом растворе добавление глутамата в концентрации 100 мкмоль/л и коагониста NMDAR глицина в концентрации 700 мкмоль/л приводило к статистически значимому падению мембранного потенциала на 6.5%, при этом контрольное значение составило 79.37 ± 0.24 мВ ($n = 270$), а после аппликации аминокислот мембранный потенциал составил 74.18 ± 0.32 мВ ($n = 140$). Эффект глутамата и глицина был обратимым, поскольку полностью исчезал после отмывки препарата. Изменение МПП во внесинаптической области не наблюдалось при аппликации аминокислот в указанных выше концентрациях (78.9 ± 0.3 мВ, $n = 110$ против 79.4 ± 0.2 мВ в контроле, $n = 270$).

Добавление блокатора NMDA-рецепторов AP5 в концентрации 500 мкмоль/л не влияло статистически значимо на мембранный потенциал покоя клетки. Однако последующая аппликация глутамата и глицина вызвала значимо меньшую деполяризацию в присутствии блокатора, которая составила 1.5% (78.15 ± 0.39 мВ против 79.37 ± 0.24 мВ в контроле), однако была статистически значимой ($n = 127$).

Отсутствие полного блокирующего эффекта AP5 может объясняться тем, что действие данного блокатора обратимо, он конкурентно связывается с участком связывания глутамата, и степень его сродства к NMDA-рецептору сходна с аффинностью глутамата, вследствие чего аминокислота может вытеснять блокатор. Чтобы добиться полного устранения эффекта аминокислот, мы использовали блокатор глицинового сайта NMDAR 5,7-DCKA (натриевая соль) в концентрации 100 мкмоль/л. Добавление 5,7-DCKA не приводило к статистически значимому изменению мембранного потенциала ($n = 79$). При совместной аппликации AP5 и 5,7-DCKA также не возникало деполяризации постсинаптической мембраны ($n = 79$). При этом на фоне этих двух блокаторов аминокислоты не вызывали достоверного падения мембранного потенциала (78.8 ± 0.22 мВ против 79.37 ± 0.24 мВ в контроле; $n = 85$).

Альтернативный способ блокады NMDA-рецепторов – это магниевый блок. И действительно, в присутствии Mg^{2+} аминокислоты не влияли на мембранный потенциал покоя мышечного волокна, в магнийсодержащем растворе в контроле он составил 78.91 ± 0.32 мВ, после добавления глицина и глутамата – 78.26 ± 0.31 мВ ($n = 105$).

Из полученных результатов можно сделать вывод, что на постсинаптической мембране имеются функциональные NMDAR, активация которых вызывает статистически значимые сдвиги мембранного потенциала покоя постсинаптической клетки в положительную сторону. Такая деполяризация обеспечивается входящим током катионов через канал рецептора, блокируется селективными блокаторами глутаматного и глицинового сайта связывания и не наблюдается в условиях сохранения магниевых блока. Данное исследование является электрофизиологическим доказательством потенциальной модуляторной роли NMDAR постсинаптической мембраны в нервно-мышечных синапсах взрослых млекопитающих.

Анализ природы изменений параметров спонтанной секреции медиатора, индуцированных γ -S-АТФ, в моторных синапсах мышцы

Проэнса Гарсия А., Богачева П.О., Балезина О.П.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), наряду со своей ролью внутриклеточного трофического соединения, способна выполнять также и роль сигнальной молекулы, участвуя в пуринергической модуляции синаптической передачи.

В периферических моторных синапсах АТФ известна как комедиатор ацетилхолина (АХ), способный высвобождаться вместе с ним при экзоцитозе синаптических везикул и модулировать нервно-мышечную передачу, действуя на свои специфические пуринорецепторы.

Среди регуляторных эффектов АТФ известны как тормозящие, так и потенцирующие синаптическую передачу. Такие различия могут быть обусловлены многообразием пуринорецепторов на пре- и постсинаптической мембране и сигнальных путей, запускаемых при их активации, концентрацией АТФ в синаптической щели и т.д.

Целью данной работы был анализ изменений параметров спонтанной секреции АХ в моторных синапсах диафрагмы мышцы при продолжительном присутствии АТФ в синаптической щели и выяснение их природы.

Регистрацию спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) в изолированных препаратах диафрагмы осуществляли внутриклеточно с помощью стандартной микроэлектродной техники отведения биопотенциалов. Сигналы регистрировали при помощи усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems, США) и записывали их с помощью аналого-цифровых преобразователей E-154 (L-Card, Россия) с интерфейсом PowerGraph на жесткий диск компьютера для последующего анализа в программе MiniAnalysis (Synptosoft, США). Достоверность различий между выборками оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad, США). Данные приведены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего (n – количество исследованных синапсов).

Для создания устойчиво повышенного уровня АТФ в синаптической щели использовали её негидролизуемое тиозамещенное производное – γ -S-АТФ (10 мкмоль).

В моторных синапсах диафрагмы мышцы аппликация γ -S-АТФ приводила к увеличению амплитуды МПКП на 21% по сравнению с контролем ($n = 84$, $p < 0.05$). Параллельно с ростом амплитуды наблюдался значительный достоверный прирост времени нарастания и полуспада МПКП на 22% ($n = 84$, $p < 0.05$). Средняя частота МПКП не изменялась: в контроле и под воздействием γ -S-АТФ составляла 0.66 ± 0.1 Гц. Мембранный потенциал

мышечных волокон также достоверно не изменялся и составлял 68.7 ± 1 мВ в контроле и 67 ± 1 мВ после аппликации γ -S-АТФ.

Наблюдаемый прирост амплитуды МПКП под действием негидролизуемого аналога АТФ мог реализоваться как на пресинаптическом уровне (за счёт увеличения размера кванта АХ), так и на уровне постсинаптической мембраны (за счёт модуляции работы каналов никотиновых холинорецепторов). В пользу последнего варианта говорит зарегистрированное в обоих типах мышц увеличение временного хода МПКП. Для проверки этого предположения, перед аппликацией γ -S-АТФ проводили предварительную инкубацию нервно-мышечного препарата с ингибитором везикулярного транспорта АХ везамиколом (1 мкмоль). Везамикол не оказался способен предотвратить прирост амплитудно-временных параметров МПКП под действием γ -S-АТФ, что убедительно подтверждает именно постсинаптическую природу обнаруженного облегчающего спонтанную секрецию АХ эффекта негидролизуемого аналога АТФ.

Известна способность АТФ, действуя на метаботропные P2Y-рецепторы постсинаптической мембраны, пролонгировать открытое состояние каналов мышечных никотиновых холинорецепторов. Это и могло быть причиной обнаруженного увеличения амплитудно-временных параметров МПКП под действием γ -S-АТФ. Избирательный антагонист P2Y1-рецепторов MRS2179 (10 мкмоль) не оказывал самостоятельного влияния на амплитудно-временные параметры и частоту МПКП, однако в его присутствии не наблюдалось возрастания амплитуды и временного хода МПКП под действием γ -S-АТФ.

Полученные данные позволяют предполагать, что в нервно-мышечных синапсах мышцы при продолжительном присутствии АТФ в синаптической щели запускается регуляторный каскад с участием постсинаптических P2Y1-рецепторов, направленный на модуляцию работы никотиновых холинорецепторов и приводящий к потенцированию параметров спонтанных синаптических потенциалов мышечной мембраны.

ГАМКергическая система в онтогенезе мышечных волокон

Сибгатуллина Г.В., Маломуж А.И.

Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) – синтезируемое ферментом L-глутаматдекарбоксилаза (GAD) соединение, которое играет роль основного тормозного медиатора в синапсах центральной нервной системы, активируя ионотропные ГАМКА и метаботропные ГАМКБ рецепторы. Оказалось, что помимо участия в функционировании зрелого мозга, ГАМК играет ключевую роль в развитии и созревании целого ряда структур ЦНС, причём, в процессе онтогенеза определённые звенья ГАМКергической сигнализации претерпевают значительные изменения.

К настоящему моменту накоплен ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о сигнальной роли ГАМК не только в ЦНС, но и в периферическом отделе нервной системы и, в частности, в нервно-мышечном синапсе. Так установлено, что в области зрелого нервно-мышечного контакта присутствует фермент GAD, обнаружены собственно молекулы ГАМК (Nurullin et al., 2018), а также выявлены ГАМКБ рецепторы, активация которых приводит к модуляции процессов выделения ацетилхолина из двигательного нервного окончания (Malomouzh et al., 2015). В тоже время данных о становлении ГАМКергической сигнализации в процессе онтогенеза нервно-мышечного контакта до сих пор практически не было, что и предопределило проведение настоящего исследования, целью которого стало оценка наличия основных элементов ГАМКергической сигнализации (молекулы ГАМК, GAD, ГАМКА и ГАМКБ рецепторов) в процессе онтогенеза мышечной ткани и нервно-мышечного контакта млекопитающего.

В работе были использованы культивируемые миоциты и ткани новорожденных и взрослых животных. Иммуногистохимический анализ показал, что молекулы ГАМК присутствуют в миоцитах на 2-е сутки культивирования и в миотрубках, образуемых впоследствии в культуре. В тканях 3-дневных крысят были выявлены мышечные волокна как окрашиваемые, так и не окрашиваемые антителами к ГАМК.

В экспериментах с антителами к GAD, ни в культуре, ни в тканях новорожденных, ни в зрелых мышечных волокнах (за пределами нервно-мышечного синапса) какой-либо иммуноположительной реакции обнаружено не было. Присутствие же GAD в области синапса снова было подтверждено. Следовательно, синтез ГАМК, имеющий место на ранних этапах развития мышечной ткани, обусловлен не активностью GAD, а происходит за счёт других, альтернативных путей. Визуализируемый же фермент в районе нервно-мышечного контакта, вероятно, имеет нейрональное происхождение.

Анализ наличия ГАМКА рецепторов в культурах миоцитов, в мышечных тканях и синапсах животных выявил стадиоспецифичные различия. Так, экспрессия ГАМКА рецепторов имела место в культивируемых миотрубках, тогда как в области терминалей новорожденных животных рецепторы

отсутствовали, но идентифицировались в синапсах взрослых животных. ГАМКБ рецепторы не идентифицировались ни в одном препарате, за исключением области синапсов взрослых животных.

Согласно Murphy and Kardon (2015), пути образования первичных и вторичных мышечных волокон различаются. Вероятно, что с прохождением этих стадий процессы метаболизма, внутри- и межклеточной сигнализации претерпевают изменения или же меняются коренным образом. Полученные нами результаты позволяют предположить, что ГАМК, по-видимому, играет определённую роль в метаболизме первичных мышечных волокон, тогда как для метаболизма вторичных волокон участие ГАМК не является необходимым. Таким образом, можно полагать, что если функция ГАМК у взрослого организма может быть связана с сигнализацией в нервно-мышечном синапсе, то на ранних стадиях онтогенеза ГАМК, по-видимому, участвует в метаболических процессах, сопровождающих миогенез.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 17-15-01279 и выполнена с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

Роль BDNF в пресинаптической модуляции вызванной секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышцы

Тарасова Е.О., Гайдуков А.Е., Балезина О.П.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

BDNF – нейротрофический фактор мозга, участвующий в регуляции развития нейронов и синапсов на ранних этапах онтогенеза. В свете исследований последних лет BDNF рассматривается в центральной нервной системе в качестве ретроградного фактора регуляции долговременной пластичности синапсов. Роль BDNF в периферических синапсах гораздо менее изучена, однако известно, что этот пептид экспрессируется в скелетной мышце. Было показано, что при электрической и/или сократительной активности мышечных волокон BDNF может выделяться из них и ретроградно действовать на TrkB-рецепторы, расположенные на мембране пресинаптического нервного окончания. В моторных синапсах ранее было описано действие экзогенного BDNF на нервно-мышечную передачу в виде потенцирования частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) или возрастания амплитуды вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП), но при этом квантовый анализ до сих пор не проводился.

Данная работа осуществлялась на изолированном нервно-мышечном препарате диафрагмы мышцы с «рассечёнными» мышечными волокнами для предотвращения их сокращения. Внутриклеточная регистрация миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных стимуляцией нерва (50 Гц, 1 с) потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществлялась с помощью стеклянных микроэлектродов. На основе зарегистрированных данных рассчитывали квантовый состав ПКП.

При действии экзогенного BDNF (1 нмоль) происходило увеличение амплитуды МПКП приблизительно на 30% по сравнению с контролем (от 0.97 мВ ($n = 21$) в контроле до 1.25 мВ ($n = 23$, $p < 0.05$) на фоне вещества). Частота МПКП также возрастала на 30% на фоне действия BDNF ($p < 0.05$, $n = 44$).

BDNF вызывал также возрастание амплитуд всех ПКП в коротком залпе на 30–32% по сравнению с контролем ($p < 0.05$, $n = 44$). Так, амплитуда первого ПКП в залпе увеличивалась от 32.47 ± 3.19 мВ ($n = 21$) в контроле до 52.58 ± 3.88 мВ ($n = 23$, $p < 0.05$) на фоне действия нейротрофического фактора. Данный прирост амплитуд ПКП происходил за счёт увеличения размера одиночного кванта, поскольку при этом параллельно возрастала амплитуда МПКП. Соответственно, квантовый состав мультиквантовых ПКП, представляющий собой отношение амплитуды ПКП к средней амплитуде МПКП в этом же синапсе, не отличался от контрольных значений практически по всему ходу залпа. Статистически значимый прирост квантового состава ПКП по сравнению с контрольными значениями наблюдался только на начальных этапах залпа (для первых семи ПКП, $p < 0.05$, $n = 44$).

Мы предполагаем, что данный прирост может быть связан с увеличением вероятности выброса везикул АХ, отражающимся в увеличении частоты

МПКП. Таким образом, увеличение амплитуды вызванных ответов на фоне BDNF может происходить двумя путями – за счёт увеличения размера кванта, а также за счёт увеличения вероятности экзоцитоза везикул. Механизмы, лежащие в основе усиления вызванной секреции медиатора под действием BDNF, подлежат дальнейшим исследованиям.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00616-а.

Исследование эффектов антагониста NMDA-рецепторов МК-801 на электрические характеристики спонтанно-активных нейронов моллюска *Helix lucorum*

Фролова А.В., Силантьева Д.И., Андрианов В.В., Гайнутдинов Х.Л.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

К настоящему моменту появилось значительное количество данных о том, что нарушения в глутаматергической системе мозга приводят к таким патологическим состояниям, как: расстройства когнитивных функций, шизофрения, амнезия, моторные дисфункции. Но, несмотря на достаточно обширные знания об участии глутаматергической системы в регуляции мозговой деятельности, данных о роли глутаматных рецепторов различных типов в функционировании отдельных нейронов нервной системы не так уж много. В соответствии с целью дополнения этих знаний задачей данного исследования было изучить влияние антагониста NMDA-рецепторов МК-801 (дизоцилпина малеат) на электрические характеристики спонтанно-активных нейронов висцерального ганглия виноградной улитки *Helix lucorum*, участвующих в регуляции респираторных движений животного.

Эксперименты были проведены на изолированном препарате нейронов *Helix lucorum*. В раствор, омывающий препарат нервной системы моллюска, добавляли МК-801 в концентрации 30 мкмоль/л. Электрофизиологические измерения проводились по стандартной методике при комнатной температуре с применением внутриклеточных стеклянных микроэлектродов. Регистрировалась спонтанная активность идентифицированных нейронов висцерального ганглия. Анализировались величины мембранного потенциала, порога генерации и амплитуды потенциала действия, средняя частота спайковой активности. Контролем служила регистрация электрофизиологических характеристик исследуемых клеток до добавления МК-801. Результаты были статистически обработаны с использованием однофакторного дисперсионного анализа с повторными изменениями (ANOVA).

Показано, что при добавлении МК-801 в раствор, омывающий препарат нервной системы моллюска, наблюдалось достоверное гиперполяризационное смещение мембранного потенциала к 15 минуте экспозиции до -43.6 ± 0.57 мВ, которое сохранялось на протяжении 40 минут (-43.94 ± 0.5 мВ) ($p < 0.05$) по сравнению со значениями в контроле: -40.21 ± 1.5 мВ ($p < 0.05$). Порог генерации потенциала действия увеличивался до 10.65 ± 0.73 мВ через 15 минут после добавления МК-801 и оставался повышенным на 40 минуте (11.32 ± 0.73 мВ) по сравнению с контрольными значениями (9.43 ± 0.76 мВ) ($p < 0.05$). Амплитуда потенциала действия начинала достоверно увеличиваться также на 15 минуте после добавления МК-801 до 59.04 ± 0.66 мВ и сохраняла повышенное значение в течение 40 минут (59.11 ± 0.8 мВ) по сравнению со значениями в контроле (50.43 ± 2.52 мВ) ($p < 0.05$). Однако статистически достоверных различий в частоте спайковой активности нейронов не обнаружилось.

Таким образом, антагонист глутаматных рецепторов МК-801 приводит к гиперполяризации мембранного потенциала спонтанно-активных нейронов, что вызывает увеличение величины порога генерации и амплитуды потенциала действия, в то же время он не снижает частоту спайковой активности. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что ионотропные глутаматные рецепторы присутствуют в спонтанно-активных нейронах виноградной улитки и вносят свой вклад в поддержание мембранного потенциала данных нейронов, однако не принимают участие в их спайковой активности.

Оценка экспрессии белков нервно-мышечного синапса скелетных мышц трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза

Хабибрахманов А.Н.¹, Нуруллин Л.Ф.^{1,2}, Мухамедьяров М.А.¹

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – прогрессирующее, фатальное, нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением мотонейронов головного и спинного мозга. Точная этиология заболевания неизвестна. Существует несколько теорий патогенеза заболевания. В ряде исследований было показано, что деструкция нервно-мышечных синапсов является важным фактором в патогенезе БАС. В настоящее время данные о детальных молекулярных механизмах развития синаптической дисфункции при БАС отсутствуют.

В настоящем исследовании проводилось сравнение интенсивности экспрессии синаптофизина и н-холинорецептора в нервно-мышечном синапсе диафрагмы трансгенных mSOD1-мышей на разной стадии заболевания (досимптомной и симптомной). В качестве контроля использовались мыши дикого типа.

Экспрессия синаптофизина и н-холинорецептора исследовалась при помощи иммунофлуоресцентного метода. Препараты диафрагмы окрашивались первичными антителами к синаптофизину, затем окрашивались вторичными антителами и альфа-бунгаротоксином (конъюгированным с тетраметилпроламином). После чего препараты диафрагмы исследовались с помощью конфокального сканирующего микроскопа. В программе ImageJ оценивались интенсивность, площадь и колокализация светимости исследуемых белков.

В результате было установлено выраженное снижение интенсивности экспрессии синаптофизина в двигательных нервных терминалях и их площади, а также разъединение пре- и постсинаптического компартментов нервно-мышечных синапсов mSOD1 мышей на симптомной стадии заболевания. Показатели mSOD1 мышей на досимптомной стадии достоверно не отличались от таковых мышей дикого типа.

Пренатальная гипергомоцистеинемия влияет на двигательную активность и созревание нервно-мышечных синапсов крыс

Яковлева О.В.², Хузахметова В.Ф.¹, Бухараева Э.А.¹, Ситдикова Г.Ф.²

¹ Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Гомоцистеин является серосодержащей аминокислотой, синтезированной из метионина (Veeranki, Tyagi, 2013). Повышение уровня гомоцистеина в плазме называется гипергомоцистеинемией (hНСУ). За hНСУ часто следуют дисфункции скелетных мышц, о чём свидетельствуют мышечная слабость, меньшая устойчивость к усталости из-за окислительного стресса, воспаления и стресса эндоплазматического ретикулума у мышей (Veeranki, Tyagi, 2013). Повышенные уровни НСУ во время беременности (пренатальная hНСУ) замедляют развитие плода, приводят к функциональным нарушениям, дефициту обучения и миопатии скелетных мышц у потомства (Герасимова и др., 2017; Яковлева и др., 2018). Целью настоящего исследования было проанализировать процессы синаптической передачи и двигательную активность у новорожденных и взрослых крыс с материнской hНСУ.

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г. (2010/63/ЕЕС) и утверждены Комитетом по этике Казанского федерального университета. Эксперименты проводились на изолированных препаратах мышц диафрагмы крыс Вистар на 6, 10 день после рождения (P6, 10) и у взрослых в возрасте P18-20. Крысята контрольной группы родились от самок, находящихся на стандартной диете. Крысята с пренатальной hНСУ родились от самок, которые ежедневно получали метионин (7.7 г/кг массы тела) с пищей, начинающейся за три недели до и во время беременности (Gerasimova et al., 2017).

Мышечную выносливость оценивали с помощью теста на выносливость Paw Grip (Weydt et al., 2003) на P6, 10, P20 и в тесте Ротарод на P20, где измерялись время до падения и пройденное расстояние (Barlow et al., 1996). Крысы с пренатальной hНСУ демонстрировали снижение мышечной силы, о чём свидетельствует сокращение времени, проведённого на сетке относительно контрольных крыс. А также у крыс с пренатальной hНСУ наблюдалось значительное сокращение времени и пройденного расстояния на вращающемся стержне, по сравнению с контролем.

С помощью внеклеточного отведения на нервно-мышечном препарате диафрагмальной мышцы крыс мы обнаружили повышенную амплитуду и более быстрое течение спонтанных и вызванных ТКП у новорожденных с hНСУ. Известно, что частота МТКП постепенно увеличивается с развитием животных (Shakirzyanova et al., 2016). Однако в hНСУ более высокая интенсивность спонтанного высвобождения медиатора наблюдалась уже у животных в возрасте P10. Аналогично, вызванное высвобождение ацетил-

холина в синапсах новорожденных животных с hНСУ было значительно выше по сравнению с контролем и не изменялось при старении и поэтому было ниже у взрослых по сравнению с контрольной группой.

Морфологию и интенсивность эндоцитоза синаптических везикул в моторных нервных окончаниях оценивали с использованием флуоресцентного красителя FM1-43 (Biotium, США, 3 мкм, Яковлева и др., 2017). В контроле на P6 наблюдались бляшкообразные нервные окончания с равномерной флуоресценцией, отражающие отсутствие дискретных активных зон, которые были заменены разветвленными терминалами на P10 и, наконец, мультиперфорированными взрослыми синапсами на P18, где дискретные пятна флуоресценции обозначали скопления синаптических везикул в активных зонах. Средняя площадь пресинаптических нервных окончаний увеличивалась с возрастом соответственно. У животных с пренатальной hНСУ зрелые формы пресинаптических терминалов с дискретными пятнами флуоресценции были обнаружены уже в течение первой недели развития, а также средняя площадь синаптических контактов была больше у животных P6 и P10 по сравнению с контролем. В то же время на P18 площадь пресинаптических терминалов была меньше по сравнению с контрольными и незрелыми типами. Флуоресцентный анализ нервных окончаний не выявил различий между двумя группами животных, таким образом, интенсивность эндоцитоза синаптических везикул не изменялась.

Наше исследование указывает на то, что пренатальная hНСУ вызывает более быстрое функциональное и морфологическое «созревание» моторных синапсов, что ведёт к ухудшению двигательной активности и выносливости мышц животных.

Оксидативный стресс и нарушение секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе мышей с аллоксановым диабетом

Ярмиев И.З., Яковлева О.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Сахарный диабет (СД) – хроническое заболевание эндокринной системы человека, характеризующееся длительным повышением концентрации глюкозы в крови, вследствие абсолютной и относительной недостаточности гормона (Said, 2007). Общим результатом неконтролируемого диабета является гипергликемия. Характеризуется нарушением обмена веществ, нейро- и нефропатия и поражение кровеносных сосудов (Старкова, 2002). Одним из патологических механизмов влияния гипергликемии на работоспособность нервной системы является нарушение антиоксидантной системы. Глутатион – полипептид, состоящий из трёх аминокислот. В клетке глутатион выступает в роли антиоксиданта и принимает участие в детоксикации продуктов метаболизма (Балаболкин, 2002). Соотношение окисленный/восстановленный глутатион является важным показателем уровня окислительного стресса в клетке (Бардымова и др., 2009). Цель нашей работы исследование оксидативного стресса и нарушение секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе мышей при моделировании аллоксанового СД.

Экспериментальный СД вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана (250 мг/кг, Sigma) после суточного голодания. Контрольным мышам вводился физиологический раствор в эквивалентном объёме. Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы лабораторных белых мышей. Для исследования процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул использовали флуоресцентный маркер FM 1-43 (3 мкмоль), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образованных синаптических везикул нервной терминали («загружается» в нервное окончание), дальнейшая стимуляция приводит выходу красителя из нервной терминали («разгрузка»), отражающее процессы экзоцитоза синаптических везикул. «Загрузку» красителя осуществляли по трём стандартным протоколам, а «разгрузку» по одному стандартному протоколу.

Генерация глутатиона задерживается в присутствии высокого уровня глюкозы. Снижение уровня глутатиона является одной из причин уменьшения активности NO при СД. Поэтому мы исследовали концентрацию восстановленного глутатиона в тканях мышей с экспериментальным СД. Исследования проводили на 45 сутки после инъекции аллоксана и физиологического раствора в различных тканях мозга, сердца, печени и мышц задних конечностей.

У контрольных животных при добавлении FM 1-43 по третьему протоколу свечение нервных терминалей составило 87 ± 2 о.е. ($n = 12$), при добавлении красителя по первому протоколу – 85 ± 2 о.е. ($n = 14$), при до-

бавлении красителя по второму протоколу – 56 ± 3 о.е. ($n = 13$). У животных с аллоксановым СД происходило усиление свечения нервных терминалей при всех трёх протоколах «загрузки» красителя: 99 ± 3 о.е. ($n = 10$, $p < 0.05$), 96 ± 2 о.е. ($n = 8$, $p < 0.05$) и 65 ± 2 о.е. ($n = 7$, $p < 0.05$).

В контроле интенсивность свечения нервных окончаний к 15 с стимуляции составила $70 \pm 2\%$, к 30 с – $63 \pm 2\%$, к концу 1 мин – $55 \pm 3\%$, по отношению к начальному уровню свечения ($n = 12$). К 20 мин стимуляции происходила полная разгрузка красителя и свечение терминалей практически не регистрировалось.

У животных с аллоксановым СД обесцвечивание нервных терминалей в течение первых 3 мин происходило медленнее, чем в контроле. Так к 15 с стимуляции интенсивность свечения составила $83 \pm 2\%$, к 30 с – $74 \pm 3\%$, к концу 1 мин – $64 \pm 2\%$, ($n = 10$, $p < 0.05$).

В контроле максимальная концентрация глутатиона наблюдалась в печени, которая является местом его синтеза. Развитие экспериментального СД соответствующее хронической гипергликемии привело к снижению концентрации глутатиона в тканях. В печени и в сердечной мышце на 45 сутки аллоксанового СД не наблюдалось достоверных изменений концентрации глутатиона ($n = 12$, $p > 0.05$), относительно контроля ($n = 12$). В мозговой ткани при СД наблюдали снижение концентрации глутатиона до 0.14 ± 0.07 мкмоль/г ткани, ($n = 21$, $p < 0.05$), относительно контроля (0.20 ± 0.01 мкмоль/г ткани; $n = 21$, $p < 0.05$). В мышцах нижних конечностей мышей при СД наблюдали снижение концентрации глутатиона до 0.11 ± 0.01 мкмоль/г ткани ($n = 21$, $p < 0.05$), относительно контроля (0.16 ± 0.01 мкмоль/г ткани; $n = 21$, $p < 0.05$).

Таким образом, при сахарном диабете в нервно-мышечном соединении мышцы происходит нарушение процесса рециклирования синаптических везикул в нервном окончании и в нервной и мышечной тканях мышей наблюдается нарушение баланса между прооксидантами и системой антиоксидантной защиты.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

Сателлитный симпозиум
«От нейрона к мозгу»

Изменение пространственной памяти у животных с пренатальным стрессом

Богатова К.С., Мухтарова Р.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Стресс – состояние повышенного напряжения организма в ответ на воздействие неблагоприятных факторов (Selye, 1936). По данным исследователей Цюрихского университета, стресс во время беременности стимулирует выработку кортизола (гормона стресса), что может приводить к ускоренному росту плода, нарушению развития внутренних органов, внутриутробной гипоксии, ухудшению плацентарного кровоснабжения. Хронический стресс в период беременности может отрицательно сказываться на потомстве, которое с возрастом страдает от таких заболеваний как инсульт и болезнь Паркинсона (Amit Shrita, 2019).

Цель данного исследования – изучение пространственной памяти крыс с пренатальным хроническим стрессом.

Было сформировано 2 группы крыс: 1) контрольная группа – крысы, рождённые от самок, находящихся в стандартных условиях вивария; 2) опытная группа – крысы, рождённые от самок, испытывающих хронический стресс до и во время беременности. Исследование крысят проводили на 21–22 дни после рождения.

Хронический стресс у самок крыс формировали в течение 2 недель, предлагая раздражающие стимулы (шум, ночное освещение, затенение дневного света, голод, лишение опилок, наклон клетки на 45°), длящиеся по 8 часов и повторяющиеся в спонтанном порядке. После 6 дней стресса самки отдыхали в течение 24 часов. По прошествии 2 недель стресса делался перерыв в 2 недели, во время которого подсаживали самца на 1 неделю. После перерыва начинался заключительный этап формирования стресса, в ходе которого продолжалось предъявление раздражающих стимулов по описанной выше схеме (Ragan et al., 2013).

Водный лабиринт Морриса является одной из основных моделей изучения пространственной памяти и процесса обучения у лабораторных грызунов. Тест проводили в цилиндрической емкости (Open Science, Россия), которая была заполнена водой, подкрашенной молоком. В известном месте устанавливали платформу под водой так, чтобы она была не видна. Животные должны были найти платформу и выбраться из воды. Обучение включало 6 подходов с перерывами в 15 секунд между каждым (кратковременная память). Животные обучались, после чего проводилась проверка запоминания положения платформы через 1 час и через 24 часа (долговременная память).

Результаты данного теста показали, что в ходе обучения уже к третьему предъявлению стимула у крыс контрольной и опытной групп латентное время поиска платформы достоверно снижалось с 23 секунд до 12 секунд, что свидетельствует о нормальном функционировании кратковременной

памяти животных и их обучаемости. К 6 предъявлению стимула процент обучаемости в контрольной группе составил 95%, в опытной – 99%.

В ходе проверки запоминания положения платформы было выявлено, что через 1 час в контрольной группе 89% крыс помнят расположение платформы, а в опытной группе – 67%. Через 24 часа в контрольной группе 78% обучившихся крыс помнят расположение платформы, в то время как в опытной группе лишь 67%.

Таким образом, можно сделать вывод, что хронический стресс самок не затрагивает процесс научения и кратковременной памяти их потомства, но негативно влияет на процессы хранения и воспроизведения полученной в процессе обучения информации.

Модуляция амплитудно-временных параметров вызванной кортикальной активности в ответ на изменения сенсорного входа в бочонковой системе новорожденных крыс

Борисова А.В.¹, Шарипзянова Л.С.¹, Сучков Д.С.¹, Шумкова В.В.¹
Научный руководитель: Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² INMED-INSERM U901, University Aix-Marseille II, Marseille, France

Являясь частью соматосенсорной системы грызунов, бочонковая кора играет важную роль во взаимодействии животного с внешним миром. Каждая кортикальная колонка получает сенсорный вход только от одной из вибрисс на мордочке животного. Известно, что при соприкосновении вибриссы с препятствием в соответствующей колонке возникает вызванная нейрональная активность. Как показано на взрослых грызунах, свойства поверхности препятствия кодируются параметрами сенсорного ответа. В то же время вопрос о том, когда появляется сенсорное кодирование, остаётся малоизученным, что и стало задачей данного проекта.

Эксперименты были выполнены на анестезированных новорожденных грызунах возрастом от 4 до 7 дней. Для регистрации внеклеточной активности в бочонковой коре использовался многоканальный электрод на кремниевой основе. Электрод помещался в кортикальные представления стимулируемых вибрисс, положение которых определялось с помощью метода регистрации внутреннего оптического сигнала. Использовались несколько протоколов стимуляции. В одном случае варьировалась скорость дефлексии отдельных вибрисс, в другом – интервалы между дефлексиями двух соседних вибрисс. В ходе анализа исследовались параметры локального полевого потенциала (ЛПП), мультинейрональной активности (МНА) и частотного спектра ответа.

Анализ полученных данных показал, что в ходе взросления животного наблюдается увеличение амплитуды и длительности вызванного осцилляторного ответа. В экспериментах с разной скоростью дефлексии было установлено, что амплитуда осцилляторного ответа положительно коррелирует со скоростью отведения вибриссы, в то время как зависимость длительности вызванного ответа демонстрировала негативную динамику от увеличения скорости дефлексии. Изменение интервала между соседними стимулами не оказывало видимого влияния на амплитуду и количество откликов ЛПП последнего из пары стимулов.

Также в ходе взросления животного отмечалось увеличение МНА в ответ на стимуляцию вибрисс. В зависимости от скорости дефлексии вибрисс выделялось 2 типа вызванной МНА: «быстрый» и «медленный». «Быстрый» профиль характеризовался большим количеством внеклеточно зарегистрированных потенциалов действия (ПД), а также прогрессивным снижением их количества к концу вызванного ответа. «Медленный» тип вызванной МНА, напротив, характеризовался меньшим количеством ПД на ответ.

Нами также были рассмотрены частотные характеристики вызванных ответов. По мере роста животного наблюдалось возрастание мощности гамма- и бета-осцилляции при сохранении пиковых частот вызванных осцилляторных ответов. Была выявлена связь мощности гамма- и бета-осцилляции со скоростью стимуляции вибриссы, когда более высокая скорость стимуляции сопровождалась осцилляторным ответом большей мощности. Чёткой связи мощности или доминирующих частот гамма- и бета-осцилляции с интервалом между стимуляциями выявлено не было.

Полученные результаты демонстрируют модулирование вызванного кортикального ответа при разных типах стимуляции. Мы предполагаем, что критический период развития бочонковой системы не только характеризуется формированием топографических соматосенсорных карт, но и соответствует периоду начала формирования механизмов сенсорного кодирования.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ № 16-15-10174).

Энторинально-гиппокампальный диалог в раннем постнатальном периоде развития у крыс

Валеева Г.¹, Яначкова С.², Рычкова В.¹, Насретдинов А.¹, Макаров Р.¹, Холмс Г.Л.³, Хазипов Р.^{1,2}, Ленк-Сантини П.-П.²

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Средиземноморский институт нейробиологии, Марсель, Франция

³ Университет Вермонта, Берлингтон, США

Развивающиеся нейронные сети генерируют ранние формы спонтанной синхронизованной активности. Основным паттерном активности гиппокампа новорожденных крыс, который первым появляется в процессе развития, являются ранние острые волны (рОВ). рОВ – повторяющиеся события, длительностью 100–200 мс, которые сопровождаются негативным локальным полевым потенциалом в *str. radiatum* и мощным разрядом нейронов пирамидного слоя CA1 области гиппокампа. Активность энторинальной коры, главной связующей структуры между неокортексом и гиппокампом, также характеризуется прерывистой вспышкообразной активностью во время неонатального периода развития. Поскольку анатомические связи между энторинальной корой и гиппокампом формируются ещё во время эмбрионального периода, то можно предположить, что данные структуры могут начать взаимодействовать уже на ранних этапах развития. Однако остаётся неизвестным, существует ли корреляция между активностью в этих двух структурах энторинально-гиппокампальной сети, и как организованы взаимоотношения между данными структурами в случае наличия такой корреляции. С помощью одновременной регистрации активности в медиальной энторинальной коре (МЭК) и гиппокампе новорожденных крыс мы обнаружили, что популяционные вспышки активности во втором и третьем поверхностных слоях МЭК предшествуют гиппокампальным рОВ. Также было показано, что отдельные нейроны поверхностных слоёв МЭК разряжаются раньше нейронов зубчатой извилины, CA3 и CA1 областей гиппокампа. Профиль плотности источников тока во время рОВ показал, что перфорантный и альвеолярный входы из энторинальной коры, а также внутригиппокампальные связи активируются совместно во время энторинально-гиппокампальных вспышек активности. Таким образом, благодаря ранним паттернам сетевой активности поддерживается синхронизация основных элементов энторинально-гиппокампальной нейронной сети.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-02083.

Морфологические и функциональные особенности ранней фазы развития фокального ишемического инсульта, вызванного эпипиальной аппликацией эндотелина

Винокурова Д.¹, Захаров А.¹, Лотфуллина Н.¹, Бурханова Г.¹, Чернова К.¹, Лебедева Ю.¹, Хазипов Р.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Средиземноморский институт нейробиологии, Марсель, Франция

Моделирование и исследование процессов ишемического повреждения мозга имеет широкое фундаментальное и прикладное значение. До 80% ишемических инсультов происходит в бассейне средней мозговой артерии (СМА), что обусловлено особенностями строения кровеносного русла. И потому большие усилия направлены на воспроизведение этого состояния в различных моделях фокального ишемического инсульта.

Поскольку существует мало сведений о вертикальном развитии фокального ишемического инсульта, в данном исследовании мы изучали ранние (несколько часов) динамические изменения спонтанной и сенсорно-вызванной активности во всех слоях баррел коры, вызванные эпипиальной аппликацией пептида эндотелин-1 (ЕТ1), обладающего мощным вазоконстрикторным действием.

Эндотелиновая модель фокального ишемического инсульта обладает такими преимуществами, как относительно небольшая инвазивность, возможность контролировать степень и длительность окклюзии путём изменения концентрации и времени аппликации ЕТ1, обратимость окклюзии.

Регистрация электрической активности проводилась в режиме постоянного тока (DC-mode) 16-канальным линейным электродом в течение 1 часа контроля, 1 часа аппликации ЕТ1 и 3 часов отмывки (PBS).

Самым ранним эффектом ЕТ1 стало градуальное снижение спонтанной и сенсорно-вызванной активности, начинающееся с поверхности и захватывающее нижележащие слои коры. Затем следовало кратковременное повышение частоты спонтанных потенциалов действия, организованных в гамма-осцилляции.

Маркером развивающегося ишемического повреждения являлось последующее возникновение волн распространяющейся деполяризации (РД), которые зарождались преимущественно во 2/3 слое и проходила последовательно через все слои коры (однако, в некоторых экспериментах РД возникла в 4 слое и распространялась в выше- и нижележащие слои).

Волна РД характеризовалась формой «перевернутого седла» с массивным относительно быстрым сдвигом потенциала (до 20 мВ), за которым следовала более длительная и менее негативная фаза «плато» с последующим вторичным негативным пиком.

РД возникали в 80% экспериментов ($n = 20$), причём почти в половине из них ($n = 9$) РД были организованы в кластеры из 3 и более эпизодов. Электрическая активность после эпизода РД была полностью заблокирована

на протяжении нескольких минут и слабо восстанавливалась в течение всего времени экспозиции ЕТ1.

Характерно, что в случае кластера первая волна РД проходила через все кортикальные слои, а последующие зарождались во всё более глубоких слоях, в то время как поверхностные слои оставались молчащими. Аналогичным образом, восстановление спонтанной активности и сенсорно-вызванных ответов между эпизодами РД происходило в глубоких, но не в поверхностных слоях, и зона полного подавления активности увеличивалась после каждой РД.

В течение 3 часов отмывки ЕТ1 активность нейронов частично восстанавливалась, но градиент подавления от поверхности к глубине сохранялся.

Во время экспозиции ЕТ1 на фоне локальных сдвигов потенциала во время РД наблюдался сверхмедленный прогрессирующий негативный сдвиг потенциала, достигавший амплитуды 70 мВ. Его начало совпадало с моментом возникновения первой РД. Интересно, что после начала отмывки данный сдвиг исчезал.

В экспериментах, где РД не развивалась ($n = 5$), также наблюдалось значительное подавление спонтанной и вызванной активности, однако восстановление после отмывки достигало более высокого уровня, чем в экспериментах с РД.

Гистологическое исследование срезов мозга во всех случаях выявило развитие конусообразного очага, наиболее обширного в супрагранулярных слоях, размеры которого имели большую вариабельность.

Таким образом, ишемическое повреждение, вызванное эпипиальной аппликацией ЕТ1, развивается градиентно от поверхности к глубине и наиболее сильно влияет на 2 и 3 слои коры, где возникает зона некроза, в то время как в глубоких слоях коры изменения менее драматичны и характерны для зоны пенумбры.

Нейроэндокринные механизмы стресс-протективных эффектов гипоксического посткондиционирования в модели депрессии у крыс

Зенько М.Ю.

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

Развитие депрессивных состояний у человека, и в моделях на животных сопровождается нарушением регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС) по механизму отрицательной обратной связи. Нарушение торможения ГГАС приводит к её гиперфункции и повышению уровня глюкокортикоидных гормонов в крови, что является характерной особенностью депрессивной патологии. Для индукции экспериментального аналога депрессии у крыс используется модель «выученная беспомощность» (ВБ), где неизбежный стресс создаётся путём электрокожной стимуляции (1 мА, 1 Гц) в замкнутом пространстве установки с токопроводящим полом, с временным интервалом случайной длительности от 1 до 15 с, 60 стимуляций. Одним из новых эффективных способов коррекции поведенческих нарушений крыс в модели ВБ является посткондиционирование умеренной гипобарической гипоксией (360 мм рт. ст., 2 ч, 3 сеанса). Механизмы гипоксического посткондиционирования до настоящего времени практически не изучены и представляют собой актуальную проблему для исследований. Цель работы состояла в анализе патологической и стресс-протективной роли глюкокортикоидных гормонов и их рецепторов, в модели экспериментальной депрессии у крыс, а также гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α при её коррекции гипоксическим посткондиционированием. Для этого был использован ингибитор синтеза глюкокортикоидов – метирапон (30 мг/кг, Santa Cruz Biotechnology Inc.), блокирующий работу 11- β -гидроксилазы, а также ингибитор трансляции HIF1 α – топотекан (1 мг/кг, Merck). Метирапон вводили за 30 минут до стрессирования и посткондиционирования, топотекан – перед каждым сеансом посткондиционирования. Эксперименты выполнены на лабораторных крысах-самцах линии Вистар из ресурсов ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН» с массой тела 200–250 г. Базальный уровень кортикостерона в крови животных оценивали методом иммуноферментного анализа. Для мониторинга развития экспериментальной депрессии на 5 и 10 сутки применяли тест «Открытое поле». Изменения числа GR-иммунопозитивных клеток в гиппокампе и фронто-париетальном неокортексе оценивали методом количественной иммуногистохимии. Развитие отсроченной депрессивноподобной патологии (группы ВБ, на 5-й и 10-й дни) было подтверждено достоверно сниженным уровнем горизонтальной двигательной активности, увеличением времени иммобилизации, а также повышенным уровнем кортикостерона в крови. Гипоксическое ПостК оказывало значимый антидепрессивный эффект – по этим показателям группа ВБ-ПостК не отличалась от интактного контроля. При блокировании выброса глюкокортикоидов в ответ на

ВБ (метирапон вводили перед стрессированием) перечисленные выше показатели не отличались от таковых у группы чистого ВБ, в то время как применение метирапона перед сеансами ПостК достоверно увеличивало время иммобилизации животных – то есть уменьшало антидепрессивный эффект ПостК. Введение топотекана перед посткондиционированием не влияло на его стресс-протективное действие в модели ВБ. Иммуногистохимическое исследование экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в экстрагипоталамических структурах, ответственных за регуляцию активности ГГАС, показало достоверное уменьшение количества интенсивных GR-иммунопозитивных клеток в зоне CA1 гиппокампа при развитии ВБ, и отсутствие достоверных изменений по сравнению с интактным контролем в группе ВБ-Постк. Уменьшение ингибиторного влияния от экстрагипоталамических структур, в данном случае гиппокампа, по-видимому, может объяснять повышенный базальный уровень глюкокортикоидов, характерный для депрессии. Таким образом, полученные в эксперименте данные указывают на то, что стрессорный выброс глюкокортикоидных гормонов не вовлекается в формирование патологии в модели «выученной беспомощности» у крыс, несмотря на то, что патология сопровождается гиперфункцией ГГАС. А патофизиологические изменения наблюдаются на уровне обратных связей в гиппокампе крыс. В отличие от этого, вызываемая гипобарическим посткондиционированием коррекция поведенческих и нейроэндокринных нарушений в этой модели требует вовлечения глюкокортикоидных гормонов, но не гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α .

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00336.

Анализ нарушений научения и памяти в крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией при лечении донором сероводорода

Зиганшина А.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Гипергомоцистеинемия – это заболевание, обусловленное избытком в организме гомоцистеина – непротеиногенной аминокислоты (Доброхотова, 2005). Гипергомоцистеинемия является предиктором патологических изменений в организме, таких как нейродегенеративные процессы и нарушение когнитивных функции у человека и животных (Мирошниченко, 2009). Сероводород присутствует в разных тканях и обладает специфической биологической активностью в физиологических концентрациях и проявляет цитопротективные эффекты (Li, 2011).

Целью данной работы было изучить эффект пренатальной гипергомоцистеинемии на двигательную активность потомства, а так же установить, снимает ли введение донора сероводорода (NaHS) матерям негативный эффект гомоцистеина у потомства.

Эксперимент проводился на крысах линии Вистар, потомство было разделено на 4 группы в соответствии с получаемыми материнским организмом веществами:

- 1) Контрольная группа, состоящая из самок на стандартном рационе питания;
- 2) Гомоцистеиновая группа (ежедневно получали метионин (7,7 г на кг веса) с едой в течение беременности и двух недель после неё);
- 3) Сероводородная группа (ежедневно получали инъекции донора сероводорода (3 мг на кг веса) в течение недели до беременности и четырёх недель после неё);
- 4) Группа гомоцистеин+сероводород получала ежедневно и метионин и инъекции донора сероводорода.

Исследовательская активность и тревожность потомства первого поколения 72–90 дней жизни отслеживались с помощью теста «Открытое поле». Крысы помещались на арену 100×100 см, разделенную на 16 квадратов и снабжённую системой записи видео. Тест представлял собой трёхминутную сессию с записью следующих параметров: горизонтальная двигательная активность (ГДА) – пересечение квадратов четырьмя лапами; вертикальная двигательная активность (ВДА) – стойки на задних лапах – являются показателем исследовательской активности грызуна; груминг – количество актов умыывания и почесываний животного; а так же время выхода из центра открытого поля и количество актов дефекации.

Для ВДА показатели гомоцистеиновой группы были несколько выше контрольных, но достоверных отличий обнаружено не было, результаты групп получавших инъекции донора сероводорода сопоставимы с кон-

трольными. Так же мы не обнаружили достоверных отличий в количестве актов дефекации среди всех четырёх групп.

ГДА гомоцистеиновой группы достоверно больше чем контрольной и сероводородной групп. Так же у гомоцистеиновых животных наблюдалось значительно большее количество актов груминга в сравнении с контрольной группой, и сероводородными группами. Время выхода из центра открытого поля не отличается у животных контрольной и сероводородных групп, хотя гомоцистеиновые животные проводили в центре гораздо меньше времени.

Таким образом терапия донором сероводорода полностью снимает патологическое влияние пренатальной гипергомоцистеинемии и этот эффект сохраняется у потомства во взрослом состоянии.

Анализ экспрессии проапоптотических и антиапоптотических белков при нейропротекторном действии форсколина в условиях эксайтотоксичности в нейронах мозжечка и коры головного мозга крыс

Иванова М.А., Абушик П.А., Антонов С.М.

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

Известно, что в условиях эксайтотоксичности глутамат способен приводить к большому входу кальция в нейроны, что вызывает кальциевую дисрегуляцию, митохондриальную дисфункцию и инициирует клеточную гибель по механизмам апоптоза и некроза. На сегодняшний день показано, что активация циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) запускает нейропротекторные сигнальные каскады. Ранее нами было показано, что форсколин обладает нейропротекторным эффектом против эксайтотоксического стресса в нейнах ЦНС и ПНС. Нами также было показано, что в нейропротекции форсколина в нейронах коры головного мозга участвуют цАМФ-зависимая протеинкиназа PKA и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназа CaMKII. В нейронах мозжечка в форсколин-индуцированный нейропротекторный каскад был обнаружен вклад протеинкиназы PKC, активация которой зависит от уровней Ca^{2+} . В связи с этим, было интересно исследовать уровень экспрессии проапоптотических белков AIF, каспазы-3, p53 и антиапоптотического белка Bcl-2 при действии форсколина в условиях эксайтотоксичности в нейронах коры мозга и мозжечка крыс *in vitro*.

Данные, полученные на первичной культуре нейронов коры мозга и мозжечка крыс, показывают низкий уровень экспрессии p53 в контрольных условиях – $28\pm 5\%$ и $25\pm 6\%$ клеток, соответственно. При действии 100 мкмоль глутамата $79\pm 6\%$ клеток коры головного мозга и $50\pm 5\%$ клеток мозжечка были иммунопозитивными. 1 мкмоль форсколина снижал уровень экспрессии белка в нейронах коры головного мозга ($36\pm 6\%$) и мозжечка ($20\pm 7\%$).

В контрольных условиях в клетках коры мозга количество иммунопозитивных клеток, экспрессирующих каспазу-3 был равен $36\pm 5\%$, в клетках мозжечка – $25\pm 6\%$. При инкубации нейронов с 100 мкмоль глутамата уровень экспрессии увеличился до $58\pm 6\%$ в нейронах коры головного мозга и до $50\pm 5\%$ в нейронах мозжечка. Добавление форсколина снижало уровень экспрессии каспазы-3 до значений $18\pm 5\%$ и $20\pm 7\%$, соответственно.

Достаточно низкий уровень экспрессии AIF был выявлен в контрольных условиях в нейронах коры ($21\pm 2\%$) и в нейронах мозжечка ($20\pm 7\%$). Действие 100 мкмоль глутамата увеличивало количество иммунопозитивных клеток на AIF до $58\pm 7\%$ и $44\pm 8\%$, соответственно. 1 мкмоль форсколина на фоне действия глутамата уменьшал уровень экспрессии данного белка до контрольных значений – $19\pm 3\%$ AIF-позитивных клеток в нейронах

коры головного мозга, однако в нейронах мозжечка уменьшение экспрессии данного белка было менее значительным – $30\pm 5\%$.

В контрольных условиях в нейронах коры наблюдался достаточно высокий уровень экспрессии этого белка Bcl-2 – $69\pm 9\%$, в нейронах мозжечка – $73\pm 8\%$. В условиях эксайтотоксичности количество Bcl-2-позитивных клеток уменьшалось до $28\pm 7\%$ и $45\pm 10\%$ для нейронов коры головного мозга и мозжечка, соответственно. Интересно, что совместная инкубация глутамата и форсколина оказывало положительный эффект на уровень экспрессии белка Bcl-2 – $91\pm 4\%$ в нейронах коры головного мозга и $82\pm 6\%$ в нейронах мозжечка, что значительно выше контрольных значений.

Таким образом, иммуноцитохимический анализ показал качественное снижение экспрессии проапоптотических белков AIF, каспаза-3 и p53 при действии 1 мкмоль форсколина совместно со 100 мкмоль глутамата по сравнению с действием только агониста в нейронах коры головного мозга и мозжечка. Уровень антиапоптотического белка Bcl-2 увеличивался на фоне действия 1 мкмоль форсколина, тем самым подтверждая его нейропротекторный эффект в нейронах коры головного мозга и мозжечка.

Работа выполнена и при поддержке РНФ проект № 16-05-10192.

Анализ экспрессии генов *Rac1*, *Bcl2*, *Cav1 α* и *Cav1 β* клеток нейробластомы, мезенхимных стволовых клеток и мононуклеарных клеток периферической крови человека при моделировании опухолевого микроокружения *in vitro*

Китаева К.В., Чулпанова Д.С., Прудников Т.С., Клетухина С.Р., Ризванов А.А., Соловьева В.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Введение. Взаимодействие клеток опухолевого микроокружения играет ключевую роль в процессах роста опухоли и развития терапевтической резистентности (Wang et al., 2017). Паракринные сигналы и прямые клеточные контакты опосредуют изменение экспрессии генов и белков, вовлечённых во множество опухолевых процессов. Так, белок кавеолин, кодируемый геном *Cav1*, является основным компонентом кавеол, которые участвуют в таких клеточных функциях как эндоцитоз, транспорт холестерина, передачу сигнала и участие в подавлении роста опухоли (Akay et al., 2010). Семейство белков *Bcl-2* представляют собой одну из контрольных точек апоптоза в сигнальном пути, опосредующем гибель клеток (Tahir et al., 2017). *Ras*-ассоциированный субстрат 1 ботулотоксина типа С3 (*Rac1*) является одной из важных сигнальных молекул, которые участвуют в регуляции миграции клеток путём перестройки цитоскелета (Gomez del Pulgar et al., 2007).

Цель. Исследовать влияние противоопухолевого препарата цисплатин на экспрессию мРНК *Bcl-2*, *Cav1 α* , *Cav1 β* , *Rac1* мезенхимных стромальных клеток, выделенных из костного мозга (КМ-МСК), клеток нейробластомы SH-SY5Y и мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) в ко-культуре.

Материалы и методы. Для создания ко-культуры клетки SH-SY5Y (модифицированные лентивирусом, кодирующим зелёный флуоресцентный белок), КМ-МСК и МКПК были смешаны в соотношении 1:1:1 (по 500 тыс. клеток) на чашках Петри. После 72 часов инкубации добавляли цисплатин (Cisplatin-LANS, Россия) в концентрации 10 мкг/мл. После 72 часов ко-культивирования с цисплатином клетки были разделены на BD FACSAria™ III (BD Biosciences, США) по спектру флуоресценции и размеру. Уровень экспрессии мРНК *Bcl-2*, *Cav1 α* , *Cav1 β* , *Rac1* определяли методом количественной ПЦР. Относительные уровни экспрессии генов-мишеней рассчитывали с использованием 18S рРНК в качестве эталонного гена.

Результаты и обсуждение. Экспрессия *Bcl-2* увеличилась в 4 раза в КМ-МСК после ко-культивирования и обработки ко-культуры цисплатином, в тех же группах наблюдалось снижение экспрессии *Bcl-2* в МКПК. Экспрессия *Bcl-2* в SH-SY5Y не имела существенных изменений. Экспрессия *Cav1 α* снизилась в 2.5 раза в SH-SY5Y после ко-культивирования и обработки ко-культуры цисплатином и более чем в 10 раз после ко-культивирования и 33 раза после обработки ко-культуры цисплатином. В МКПК экспрес-

сия Cav1 α выросла в 27 и 70 раз после ко-культивирования и обработки ко-культуры цисплатином соответственно. Экспрессия Cav1 β снизилась в 10 раз в КМ-МСК и в 2 раза в SH-SY5Y после ко-культивирования и обработки ко-культуры цисплатином, в МКПК экспрессия Cav1 β выросла в 10 раз после ко-культивирования и 20 в раз после обработки ко-культуры цисплатином. Экспрессия Rac1 снизилась 1.5 раза в МКПК и SH-SY5Y после ко-культивирования и обработки ко-культуры цисплатином, в КМ-МСК экспрессия Rac1 выросла в 1.5 раза после ко-культивирования и 2.2 раза после обработки ко-культуры цисплатином. Полученные данные могут указывать на активное участие МКПК в процессах ингибирования роста опухолевых клеток, снижения их метастатического потенциала, а также в подавлении поддерживающих опухоль свойств КМ-МСК.

Литература

1. Wang M., Zhao J., Zhang L., Wei F., Lian Y., Wu Y., Gong Z., Zhang S., Zhou J., Cao K., Li X., Xiong W., Li G., Zeng Z., Guo C.: Role of tumor microenvironment in tumorigenesis // *J. Cancer*. 2017, no.8(5), pp.761–773, doi:10.7150/jca.17648.
2. Akay I., Oxmann D., Helfenstein A., Mentlein R., Schunke M., Hassenpflug J., Kurz B.: Tumor risk by tissue engineering: cartilaginous differentiation of mesenchymal stem cells reduces tumor growth // *Osteoarthritis Cartilage*. 2010, no.18(3), pp.389–396, doi:10.1016/j.joca.2009.10.015.
3. Tahir I.M., Iqbal T., Jamil A., Saqib M.: Association of BCL-2 with oxidative stress and total antioxidant status in pediatric acute lymphoblastic leukemia // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2017, no.31(4), pp.1023–1027.
4. Gomez del Pulgar T., Bandres E., Espina C., Valdes-Mora F., Perez-Palacios R., Garcia-Amigot F., García-Foncillas J., Lacal J.C.: Differential expression of Rac1 identifies its target genes and its contribution to progression of colorectal cancer // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007, no.39(12), pp.2289–2302, doi:10.1016/j.biocel.2007.06.014.

Роль нмда-рецепторов в механизме действия сероводорода на сетевую активность гиппокампа крыс

Курмашова Е.Д., Гатаулина Э.Д., Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Известно, что эндогенный сероводород H_2S участвует в различных физиологических и патофизиологических процессах. В нервной системе синтез H_2S обеспечивается ферментом цистатионин β -синтаза. Показано, что высокий уровень экспрессии фермента необходим в ранние периоды развития организма для созревания нейрональных сетей и их защиты в условиях оксидативного стресса. Одной из мишеней действия H_2S является НМДА-рецепторы. Так показано, что в первичной культуре нейронов мозжечка H_2S усиливает НМДА-ток за счёт активации аденилатциклазы. В тоже время, в незрелых нейронах гиппокампа донор H_2S вызывает угнетение НМДА-вызванного тока, и подавляет спонтанную сетевую активность гиппокампа у новорожденных крысят. Одной из главных мишеней действия H_2S в центральной нервной системе – N-methyl-D-aspartate (NMDA)-рецепторы. NMDA-рецепторы – это гетеромерные комплексы, состоящие из двух облигатных GluN1-субъединиц и двух GluN2- или GluN3-субъединиц. Целью исследования было оценить роль субъединичного состава NMDA-рецепторов в эффектах H_2S донора – NaHS на NMDA-опосредованные токи пирамидных нейронов гиппокампа в первую и третью неделю постнатального развития мозга.

Эксперименты проводились на горизонтальных срезах головного мозга новорожденных и взрослых крысят (P3–P7 и P18–P26, где P0 – день рождения). НМДА-опосредованные токи пирамидных нейронов гиппокампа и ответы рекомбинантных NMDA-рецепторов экспрессируемых в HEK293T клетках регистрировали при помощи пэтч-кламп регистрации, в режиме «целая клетка». В качестве донора H_2S использовался NaHS в концентрации 100 мкмоль. Для ингибирования аденилатциклазы применялся селективный блокатор MDL-12330A (Sigma, США).

Анализ синаптических токов, вызванных активацией глутаматных рецепторов выявил, что донор H_2S оказывал необратимый ингибирующий эффект на амплитуду NMDA-вызванного синаптического тока нейрональной клетки у новорожденного крысенка в СА3 области гиппокампа, в тоже время в гиппокампе взрослых крысят H_2S вызывал потенциацию NMDA-индуцированных ответов. Предварительное ингибирование аденилатциклазы не снимало эффекты H_2S на НМДА-вызванные токи пирамидных нейронов гиппокампа как у новорожденных, так и у взрослых крыс.

Анализ действия H_2S на NMDA-рецепторы экспрессируемые в HEK293T клетках показал, что эффекты донора сероводорода на амплитуду вызванного тока зависят от субъединичного состава глутаматного рецептора. Так H_2S усиливал ток через GluN1/2A NMDA-рецепторы, а в клетках с GluN1/2B субъединицей происходило подавление NMDA-вызванного ответа. В тоже время донор H_2S ускорял кинетику восстановления и десенситизации НМДА-

рецепторов как в клетках экспрессирующих GluN1/2A, так и GluN1/2B. В присутствии восстановителя DTT действие H_2S не проявлялась лишь в клетках экспрессирующих GluN1/2A NMDA-рецепторы.

Таким образом, возрастные различия действия H_2S можно объяснить изменением активности редокс-центра GluN1-субъединицы, структурными различиями и уровнем экспрессии GluN2 субъединиц и функциональную гетерогенность NMDA-рецепторов в нейрональных клетках гиппокампа. Предполагается, что H_2S в первую неделю постнатального развития гиппокампа вызывает угнетение сетевой активности, за счёт активации GluN1/2B субъединицы NMDA-рецепторов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-00618.

Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на вызванные НМДА-ответы пирамидных нейронов СА3 зоны гиппокампа крыс

Курмашова Е.Д., Гатаулина Э.Д., Яковлев А.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Гомоцистеин (ГЦ) – это эндогенно синтезируемая аминокислота, обладающая окислительно-восстановительной активностью, которая вносит немалый вклад в развитие различных нейродегенеративных расстройств. Вследствие увеличения концентрации ГЦ в плазме крови свыше 15 мкмоль/л, возникает такое заболевание, как гипергомоцистеинемия (ГГЦ). Данное заболевание проявляется при недостатке витаминов группы В и генетических нарушениях ферментов. Пренатальная ГГЦ может приводить к таким последствиям, как фетоплацентарная недостаточность, отслоение плаценты, поздний гестоз беременных, внутриутробная смерть плода. Известно, что ГЦ и его производные являются агонистами, действующим через сайты связывания глутамата в НМДА рецепторах. Кроме того, относительно высокие концентрации ГЦ (выше 1 ммоль) могут конкурировать с глицином за сайты связывания коагонистов НМДА рецепторов.

Целью данного исследования стало изучение влияния пренатальной ГГЦ на НМДА-опосредованные токи в пирамидальных нейронах гиппокампа крыс в ранний постнатальный период.

Эксперименты проводились на горизонтальных срезах гиппокампа крысят (P3–P7, где P0 – день рождения). НМДА-опосредованные токи пирамидных нейронов регистрировали при помощи методики пэтч-кламп, в режиме «целая клетка» с фиксацией потенциала на -60 мВ. Фиксировались максимальная амплитуда каждого вызванного НМДА ответа, и площадь каждой записи измерялась интеграцией после обнуления базовой линии.

Крысята с пренатальной ГГЦ были рождены от крыс, получающих ежедневно метионин с пищей, начиная за 3 недели до беременности и спустя 2 недели после родов. Концентрация гомоцистеина в плазме крови контрольных животных составляла 7 ± 1 мкмоль ($n = 14$). У экспериментальной группы происходило значительное увеличение концентрации – 30 ± 5 мкмоль ($n = 14$).

Анализ данных показал, что при локальной аппликации НМДА средняя амплитуда вызванного ответа в условиях хронической ГГЦ составила 1628 ± 214 пА ($n = 15$), что незначительно больше показателей в контроле 1533 ± 154 пА ($n = 13$). Однако анализ показателей площади вызванных НМДА ответов, выявил достоверный рост значений в условиях пренатальной ГГЦ $(5.7 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ пА·мс ($n = 15$), относительно контроля $(4.3 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ пА·мс ($n = 13$, $p = 0.05$).

Исследование пирамидных нейронов гиппокампа показало, что в модели пренатальной ГГЦ происходит увеличение площади вызванных НМДА-

опосредованных ответов. Это свидетельствует об усилении активации НМДА рецепторов за счёт патологического роста концентрации межклеточного ГЦ. Таким образом, ГЦ, являясь агонистом высокой аффинности НМДА рецепторов влияет на увеличение скорости десенситизации.

Гамма-осцилляции при распространяющейся депрессии в соматосенсорной коре крыс

Насретдинов А.¹, Винокурова Д.¹, Лотфуллина Н.¹, Бурханова Г.¹, Чернова К.¹, Лебедева Ю.¹, Хазипов Р.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Средиземноморский институт нейробиологии, Марсель, Франция

Считается, что распространяющаяся депрессия (РД) является физиологической основой для мигрени с аурой. В данной работе исследовалась сетевая динамика в нескольких слоях соматосенсорной коры крыс во время РД с использованием линейных 16-канальных матриц электродов для регистрации локальных полевых потенциалов и множественных потенциалов действия (МПД). Волны РД, вызванные аппликацией КС1 на поверхность коры, характеризовались высокоамплитудными негативными сдвигами потенциала и распространялись по направлению сверху вниз. Непосредственно перед РД следовало значительное повышение частоты МПД продолжительностью 3–10 секунд, организованное в виде гамма-осцилляций. Такие осцилляции имели различные свойства в зависимости от слоя коры, кроме того, наблюдалась корреляция активности в гамма-диапазоне между слоями L2/3 и L5. Сенсорно-вызванные ответы и спонтанная активность при этом постепенно снижались и полностью исчезали во время медленного негативного сдвига потенциала. Сенсорно-вызванные потенциалы полностью восстанавливались до контрольных значений в течение нескольких минут после начала РД, в то время как спонтанная активность оставалась на сниженном уровне в течение длительного времени. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что кратковременное гамма-возбуждение с последующей длительной депрессией спонтанной и сенсорно-вызванной активности способствует позитивным и негативным симптомам мигрени с аурой.

Работа поддержана грантом РФФ № 17-15-01271.

Изучение поведенческих эффектов КАПАХ – препарата с мультитаргетным механизмом действия – на модели болезни Альцгеймера у крыс, вызванной стереотаксическим введением бета-амилоида в область гиппокампа

Никитин Д.О., Никитина А.В., Семина И.И.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Болезнь Альцгеймера (БА) является одним из самых прогрессирующих и опасных нейродегенеративных поражений в мире. Для данного заболевания характерны расстройства кратковременной и долгосрочной памяти, нарушения мышления и поражения когнитивных функций. Несмотря на то, что человечество давно знакомо с этой проблемой, не существует полного понимания как механизмов возникновения и развития болезни, так и эффективных способов лечения данной патологии. Именно поэтому важно изучить особенности развития БА на различных моделях и найти способы коррекции психических нарушений.

Ранее было показано, что хлорэтокси-пара-N-диметиламинофенил-фосфорилацетогидразид (КАПАХ) способен корригировать поведенческие нарушения у дабл-трансгенных мышей с болезнью Альцгеймера и обладает мультимодальным механизмом действия, воздействуя на разные звенья патологического процесса.

Целью данного исследования явилось моделирование болезни Альцгеймера на крысах путём введения основного маркера при этой патологии – бета-амилоида в гиппокамп крыс, изучение поведенческих характеристик и исследование возможности коррекции нарушений поведения с использованием КАПАХ.

Методы исследования: Моделирование болезни Альцгеймера осуществляли путём билатерального стереотаксического введения крысам-самкам линии Wistar бета-амилоида (1-42) в область гиппокампа по координатам стереотаксического атласа (-3,6; 2(-2);1,8). Затем крыс поделили на 2 группы по 8 животных, одной из которых ежедневно в течение 10 дней вводили КАПАХ (леченые животные) в дозе 10 мг/кг внутривнутрибрюшинно. Контрольной группой служили крысы, которым стереотаксически в те же области вводили только растворитель бета-амилоида – фосфатный буфер PBS. После 10 дней введения препарата поведение животных исследовали на моделях: «Водный лабиринт Морриса», «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», позволяющих оценивать широкий спектр поведенческих особенностей. Результаты обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Для оптимизации работы все эксперименты регистрировались с помощью специальной программы ANYMAZE. В результате исследования установлено, что крысы с моделью болезни Альцгеймера показали отличия в поведении по сравнению с животными контрольной группы на поведенческих моделях. Так, на модели «Открытое поле» установлено, что «нелеченые» показывают снижение исследовательской активности на 35%

($p < 0.05$), при этом не влияя на показатели двигательной активности. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» показано, что «нелеченные» крысы демонстрируют высокий уровень тревожности, практически не находясь в открытых рукавах лабиринта – время нахождения в них составило всего 32% ($p < 0.05$). В тесте «Водный лабиринт Морриса» «нелеченные» животные тратили больше времени на ориентацию в знакомой местности 33% ($p < 0.05$), тогда как в случае ориентации в незнакомой местности разницы во времени не наблюдалось.

Профилактическое введение КАПАХ (группа «леченых» животных) корригировало некоторые поведенческие нарушения, приближая показатели к показателям контрольной группы. Так, у крыс «леченой» группы отмечено увеличение числа заглядываний в норки на 43% ($p < 0.05$) по сравнению с «нелечеными» на модели «Открытое поле», что свидетельствует о повышении их исследовательской активности; в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» введение КАПАХ несколько снижало симптомы тревожности, увеличивая на 42% ($p < 0.05$) время нахождения в открытых рукавах лабиринта. Неоднозначные эффекты были отмечены в «Водном лабиринте Морриса» – «леченые» крысы, напротив, тратили больше времени на ориентацию в знакомой местности по сравнению с нелечеными, также не влияя при этом на время ориентации в незнакомой местности.

Таким образом, результаты экспериментов показали целесообразность и необходимость дальнейших исследований эффективности КАПАХ на моделях нейродегенерации у грызунов.

Изучение поведенческих нарушений у крыс с моделью аутизма и разработка подходов для их лекарственной коррекции

Никитина А.В., Никитин Д.О., Семина И.И., Шиловская Е.В.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Аутизм относится к болезням развития нервной системы и характеризуется отклонениями в социализации и общении, неадекватным социальным поведением, а также ограниченным, повторяющимся поведением. В настоящее время экспериментальные исследования сосредоточены на поиске адекватных моделей аутизма с последующим тестированием на различных поведенческих моделях.

Целью настоящего исследования является изучение поведенческих нарушений эмоционального и социального характера у крыс с моделью аутизма, вызванного путём перинатального введения вальпроевой кислоты.

Методы исследования. В качестве модели аутизма использовали вальпроевую модель, которая, по литературным данным, имитирует поведение людей с расстройствами аутистического спектра: у животных отмечено появление повторяющегося стереотипного поведения, нарушение инициации и ограничение социальных контактов, а также аномальный циркадный ритм. Для формирования экспериментального аутизма самкам крыс линии Вистар на 12 день гестации подкожно, в дорсальный отдел шеи, вводили вальпроевую кислоту из расчёта 500 мг/кг. Исследования проводили на потомстве этих крыс, достигшем ювенального возраста (90 дней).

При проведении тестов осуществлялась видеорегистрация поведения животных в течение времени, предусмотренного методиками с использованием видеотрекинга и компьютерной программы Noldus (Нидерланды). Изменения эмоционально-поведенческих реакций и тревожности у крыс с вальпроевой моделью аутизма изучали на установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия). Для выявления особенностей социального взаимодействия и поведения животных использовали установку «Трёхкамерный социальный тест» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия) и расширенный вариант теста «Открытое поле» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия). Влияние на обучаемость и кратковременную память оценивали с помощью теста «Т-образный лабиринт» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия). Результаты обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

В опыте «Приподнятый крестообразный лабиринт» установлено, что и самцы и самки с экспериментальной моделью аутизма больше времени находятся в закрытых рукавах установки, по сравнению с контролем, что свидетельствует о более высоком уровне тревожности. Так, группа самок с моделью аутизма находилась в закрытой части лабиринта на 51% больше ($p < 0.05$), а группа самцов – на 47% ($p < 0.05$) соответственно по сравнению с контролем.

При проведении трёхкамерного социального теста установлено, что время, проведённое опытными самками с незнакомым животным, как новым социальным объектом, составило 35% ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой, что может говорить о нарушении социального поведения у животных. У группы самцов не было выявлено достоверных различий между контрольными и опытными группами.

При изучении мнемотропных свойств на установке «Т-образный лабиринт» было показано, что у группы самцов с экспериментальным аутизмом число правильных ответов (заходы в рукав, где находилась пища) было на 47% ($p < 0.05$), а у самок на 54% ($p < 0.05$) больше по сравнению с контрольной группой. Кроме того, самки опытной группы практически в 2.1 раза ($p < 0.05$) быстрее делают выбор между рукавами, чем животные контрольной группы. В группе самцов значимых различий не наблюдалось. Эти результаты могут свидетельствовать о более выраженной кратковременной памяти у крыс с РАС. С другой стороны постоянный заход в один и тот же рукав может демонстрировать проявление стереотипного поведения животных, что характерно для крыс с расстройствами аутистического спектра.

Таким образом, результаты проведённых исследований показали, что крысы с моделью аутизма демонстрируют в разной степени выраженные нарушения поведенческих реакций, в том числе, показатели тревожности и изменения социального поведения по сравнению с контрольными животными. Выявленные нарушения поведения могут являться мишенями для воздействия лекарственными средствами различных групп с целью коррекции поведенческих нарушений у животных с РАС.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-00-01658 КОМФИ.

Механизмы асинхронного выброса нейромедиатора в холецистокинин-положительных синапсах гиппокампа мыши *in vitro*

Рахматуллина Ф.Ф., Вазетдинова А.А., Розов А.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Асинхронный выброс нейромедиатора интенсивно исследовался на протяжении двух последних десятилетий, однако механизмы вызывающие этот феномен остаются малоизученными. Несмотря на то, что многократно была продемонстрирована зависимость асинхронного выброса нейромедиатора от увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , источник длительного входа Ca^{2+} до сих пор не идентифицирован. В настоящее время имеются предположения о том, что в основе асинхронного выброса нейромедиатора могут лежать одна или несколько ниже перечисленных причин:

- 1) вход кальция в пресинаптическое нервное окончание через Ca^{2+} проницаемые каналы (NMDA рецепторы и/или ванилоидные рецепторы TRPV1);
- 2) выброс кальция из внутриклеточных депо;
- 3) замедление выведения Ca^{2+} из пресинаптического нервного окончания.

Эксперименты проводились на срезах гиппокампа мышей обоих полов (P14-21). Парная патч-кламп регистрация синаптически связанных нейронов (интернейрон-пирамида) проводилась в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока и потенциала.

В ряде исследований было показано, что NMDA рецепторы глутамата могут экспрессироваться на пресинаптических нервных окончаниях ГАМКергических интернейронов. Соответственно, активация этих каналов в состоянии вызывать длительный NMDA-опосредованный вход Ca^{2+} и таким образом запускать асинхронный выброс нейромедиатора. Тем не менее, блокада NMDA каналов селективным антагонистом (D-AP5) не приводила к изменению амплитуды и длительности асинхронного выброса нейромедиатора.

Известно, что ванилоидные рецепторы первого типа (TRPV1) могут обеспечить альтернативный вход Ca^{2+} в пресинаптические терминали. Однако также как и в случае NMDA каналов селективная блокада TRPV1 рецепторов не влияла на параметры асинхронного выброса нейромедиатора, что указывает на отсутствие роли этих рецепторов в генерации изучаемого феномена.

Высокочастотная активация пресинаптических потенциал-чувствительных Ca^{2+} каналов может вызывать Ca^{2+} -индуцированный выход кальция из внутриклеточных депо через активацию рианодиновых рецепторов и приводить к выбросу нейромедиатора. В частности, данный механизм был описан для нервно-мышечного соединения холоднокровных. Аппликация рианодина в концентрации 100 мкмоль не изменяло амплитуду и длительность асинхронного выброса нейромедиатора в синапсах сформированных ССК+ интернейронами на телах пирамидных клеток.

В большинстве синапсов вывод Ca^{2+} из пресинаптического нервного окончания осуществляется за счёт белков плазматической мембраны. Ca^{2+} -АТФаза плазматических мембран имеет высокое сродство к ионам кальция, но относительно низкую скорость работы, а $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, наоборот, имеет низкое сродство, но высокую скорость переноса Ca^{2+} . Поэтому, в первой серии экспериментов был оценен эффект влияния селективного блокатора Ca^{2+} -АТФазы CEDA SE (100 мкмоль) на амплитуду синхронных ответов, а так же на амплитуду и длительность асинхронного выброса. При добавлении в перфузируемый раствор CEDA SE мы наблюдали отсутствие эффекта вещества на амплитуду и динамику ГАМК-опосредованных токов.

Известно, что в некоторых случаях, например, после пачки потенциалов действия, которая значительно увеличивает концентрацию Na^+ в пресинаптическом нервном окончании, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник может значительно замедлять свою работу, а в определённых состояниях реверсировать и закачивать кальций в терминаль, тем самым вызывая асинхронный выброс нейромедиатора.

В отдельных экспериментах были оценены эффекты блокады входа Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник на амплитуду и длительность асинхронного выброса нейромедиатора. Апликация блокатора $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника KB-R7943 (20 мкмоль) существенно подавляла амплитуду и длительность асинхронного выброса нейромедиатора.

Полученные данные свидетельствуют о том, что Ca^{2+} -АТФаза не принимает участия в регуляции базового уровня кальция в тормозном синапсе между ССК-интернейроном и пирамидным нейроном, тем самым, не может вносить существенный вклад в инициацию асинхронного выброса нейромедиатора тогда как, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник вовлечён в повышении концентрации Ca^{2+} , необходимого для асинхронного выброса нейромедиатора.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-0061).

Оценка взаимосвязи между адаптивными возможностями и речевыми нарушениями у детей с РАС

Семина И.И., Яхин К.К., Сабиров И.С., Сафиуллина Л.Р., Валеева Е.В.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия
Республиканская клиническая психиатрическая больница им. акад. В. М. Бехтерева,
Казань, Россия

Актуальность. Расстройство аутистического спектра – состояние нарушенного психического развития, характеризующееся отсутствием способности к социальному взаимодействию и функционированию, стереотипностью поведения и расстройством коммуникации, приводящими к социальной дезадаптации. Согласно данным ВОЗ к 2018 году встречаемость аутизма в детской популяции составила 1 к 160 (1 к 59 в США). По данным МЗ РТ в республике на 2018 год зарегистрировано 542 ребенка с верифицированным диагнозом «аутизм», каждый из которых имеет системные нарушения речи различной степени выраженности. Так же к проявлениям нарушений речевого развития при РАС можно отнести: мутизм, отсутствие обращения, неправильное употребление местоимений, эхолалии, слова-штампы, нарушения лексики, семантики, грамматического строя речи. Изучение взаимосвязи между выраженностью генетически обусловленных системных речевых нарушений у детей с РАС и особенностью их адаптивного профиля развития остаётся малоизученным и весьма актуальным.

Цель. Исследование особенностей формирования речи и адаптивных возможностей у детей с аутизмом, обусловленных полиморфизмом аллелей в группах генов (ROBO, FOXP2, SRPX2, CTNAP2), ответственных за развитие коммуникативных навыков.

Задачи. Выявление наличия взаимосвязи между системными нарушениями речи у детей с верифицированным диагнозом «аутизм» и адаптивными возможностями.

Методы исследований: а) клинико-психометрические методы: обследовано 49 детей в возрасте 3–6 лет, находящиеся на обследовании и лечении на базе 10 детского отделения для детей с психическими расстройствами и детского дневного стационара «РКПБ им. В. М. Бехтерева» МЗ РТ с установленным диагнозом «аутизм», согласно критериям диагностики общих расстройств развития по МКБ 10 (F84.01, F84.02), набравшие от 30 до 36 баллов по рейтинговой шкале аутизма С.А.Р.С. Проведена клиническая оценка выраженности аутистического синдрома при помощи шкал ADOS-2 и ADI-R; б) генетические методы: сбор буккального эпителия, выделение ДНК и генотипирование полиморфных маркеров методом ПЦП в реальном времени (амплификатор CFX96, BioRad).

Результаты. По результатам интервьюирования родителей были выявлены следующие медико-социальные параметры: в зависимости от пола – 82% мальчиков, 18% девочек. Анализ речевых карт показал следующие результаты: общие нарушения речи (ОНР) 1 степени выявлены у 24% детей, ОНР 2 уровня у 43% и ОНР 3 уровня у 33% пациентов. С помощью

протокола обследования по методу «Определения речевых нарушений у детей с аутизмом» были сформированы речевые профили с последующим анализом их адаптивных возможностей, позволившие нам разбить детей условно на три группы:

1 группа – дети для которых ведущими симптомокомплексами являлись низкие темпы формирования экспрессивной и импрессивной речи (среднее значение 87 баллов по параметру нарушения коммуникативных навыков) а так же выраженное нарушение моторных навыков (среднее значение 118 баллов), при этом имеющие удовлетворительный уровень формирования социальных навыков (34 балла), её составили 24% пациентов;

2 группа – дети с преимущественными нарушениями в инициации речи и отсутствием социального использования имеющихся речевых навыков (средние значения в 46 баллов по параметру коммуникативных возможностей и 35 баллов по уровню социальному развитию), её составили 38% пациентов;

3 группа – дети, для которых ведущими являлись нарушения в лексико-грамматическом строе речи и низкий уровень формирования тональной модуляции речи (средние баллы по коммуникативному и социальному развитию, соответственно, 42 и 31 балла), её составили 38% пациентов.

Проведено изучение нарушений функционирования в отдельных группах генов (ROBO, FOXP2, SRPX2, CTNAP2), ответственных за развитие речи у детей а так же определение вклада «фактора внутренней речи» при становлении общего психического развития у детей с РАС в сравнении со здоровыми детьми в этом же возрасте.

Выводы. Клинико-логопедическое описание ведущих симптомокомплексов в выявленных групп показало различия в показателях адаптивных возможностей, которые не всегда коррелируют с тяжестью системных речевых нарушений. Для оценки специфического вклада «речевого фактора» необходимо дальнейшее изучение нарушений функционирования в отдельных группах генов (ROBO, FOXP2, SRPX2, CTNAP2), ответственных за развитие вербальных навыков у детей, а так же выявление механизмов интериоризации «фактора внутренней речи» и формирования ассоциативной сферы, при становлении общего психического развития у детей с РАС.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-00-01658 КОМФИ.

Корреляция активности инфрагранулярных и гранулярных слоёв во время ранних ритмов активности в бочонковой коре соматосенсорной системы новорожденных крыс

Сучков Д.С.¹, Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² INMED-INSERM U901, University Aix-Marseille II, Marseille, France

Для соматосенсорной системы грызунов первая послеродовая неделя является критическим периодом развития. В это время происходит формирование сенсорных карт в бочонковой коре. Важный вклад в этот процесс вносит нейронной активность запускаемая периферическими сенсорными входами. Так, например, сенсорная депривация вибрисс во время первой послеродовой недели приводит к анатомическому и функциональному исчезновению соответствующих им кортикальных колонок. Важно отметить, что в этот период в гранулярном слое соматосенсорной коры наблюдаются уникальные ритмы электрической активности, такие как ранние гамма осцилляции (30–60 Гц) и веретенообразные осцилляции (5–25 Гц). В то же время эти ритмы имеют большое сходство с осцилляторной активностью наблюдаемой у взрослых животных, такой как гамма осцилляции и сонные веретена. Также было показано, что у взрослых животных инфрагранулярный слой оказывает модулирующее воздействие на активность в гранулярном слое коры. Например, в зрительной коре было продемонстрировано что инфрагранулярные слои оказывают тормозное влияние на вышележащие слои неокортекса. Однако, остаётся вопрос о возрастном профиле этого механизма и о его вкладе в формирование соматосенсорных карт во время критического периода развития соматосенсорной системы.

Для проверки нашей гипотезы была проведена серия *in vivo* экспериментов с использованием многоплечевых многоканальных электродов, размещённых в неокортексе на разной глубине. Положение интересующих представителей вибрисс, предварительно, было определено с помощью метода внутреннего оптического сигнала. Для получения вызванных веретенообразных осцилляций использовалась одновременная множественная стимуляция вибрисс. Используя гистологическую реконструкцию были определены положения внеклеточных электродов в кортикальной колонке.

Во время проведённых исследований мы впервые обнаружили, что на глубинах соответствующих положению инфрагранулярного слоя наблюдается вызванная мультиклеточная активность коррелирующая с мультиклеточной активностью гранулярного слоя. На основе длительности межпикового интервала вызванной осцилляторной активности в гранулярном слое была проведена сортировка событий (циклов осцилляции) на гамма и бета циклы (<30 мс и >30 мс, соответственно). Результаты корреляционного анализа мультиклеточной активности (МКА) показали, что характер спайкования в гранулярном и инфрагранулярном слоях для гамма и бета классов разительно отличается. Во время гамма циклов для гранулярного и инфрагранулярного слоёв характерна высокая вероятность спайкования

строго привязанная во времени к негативному пику осцилляции. В то же время активность во время эпизодов бета активности характеризуется уменьшением количества потенциалов действия как в гранулярном, так и в инфрагранулярном слоях и снижением синхронности спайкования. Несмотря на уменьшение степени привязки МКА обоих слоёв к негативному пику гамма осцилляции их относительное положение друг к другу оставалось неизменным и составляло 2.3 ± 1.5 мс. В то же время для бета циклов полученные данные показали, что МКА в обоих слоях возникает либо одновременно, либо не имеет строгой последовательности. Этот феномен может, на наш взгляд иметь ключевое значение в формировании бета ритмов активности, однако требует тщательного анализа, включающего в себя исследование активности в таламусе.

Таким образом, впервые было показано, что во время первой неонатальной недели развития крысы инфрагранулярный слой соматосенсорной коры интенсивно вовлечён в модулирование вызванной осцилляторной активности в соматосенсорном неокортексе во время одновременной множественной стимуляции вибрисс. Положение регистрируемой активности инфрагранулярного слоя в сочетании с гистологическими данными позволило сделать предположение, что подобный характер активности могут проявлять клетки 6А или 5В слоя неокортекса. Однако, несмотря на полученные во время исследования данные о корреляции вызванной активности инфрагранулярного слоя с активностью в гранулярном слое, следует отметить, что активность инфрагранулярного слоя обладает низкой частотой появления, что ставит вопрос о её регулярности.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00924.

Анализ противоопухолевой активности мезенхимных стволовых клеток, загруженных препаратом цисплатин, в культуре клеток нейробластомы *in vitro*

Тазетдинова Л.Г., Чулпанова Д.С., Фазлеева И.И., Филин И.Ю., Соловьева В.В., Ризванов А.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Введение. Микроокружение опухоли представляет собой динамическую среду, состоящую из различных типов клеток, в том числе и мезенхимных стволовых клеток (МСК). Известно, что МСК способны избирательно мигрировать в области опухолеобразования (Whiteside, 2008). Тропизм к опухолевому микроокружению и способность поглощать противоопухолевые препараты без проявления существенных признаков токсичности (Nils et al., 2016), МСК можно рассматривать в качестве перспективного вектора для доставки противоопухолевых агентов.

В химиотерапии онкологических заболеваний цисплатин (CDDP) является одним из эффективных противоопухолевых препаратов. Основным эффектом, производимым CDDP в опухолевых клетках – ингибирование синтеза ДНК путём специфического связывания и образования «платинового аддукта» (Harder, Rosenberg, 1970).

Целью настоящей работы является исследование противоопухолевой активности МСК, загруженных химиотерапевтическими лекарственными препаратами, в культуре опухолевых клеток *in vitro*.

Материал и методы. МСК из жировой ткани были выделены с помощью ферментативной обработки 0.2% раствором коллагеназы. Экспрессию поверхностных антигенов анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием специфичных антител к следующим CD-маркерам: CD90, CD44, CD73, CD29, CD166, CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR.

Для загрузки МСК была выбрана нетоксическая концентрация CDDP 5 мкг/мл, которую подбирали с помощью MTS-теста. После инкубации с CDDP МСК трипсинизировали и дважды промывали раствором Хенкса (Панэко), после чего переносили в новый культуральный флакон. Через 48 часов инкубации собирали кондиционированную среду (КС) и наносили её на клетки SH-SY5Y (нейробластома). После 24 часов инкубации анализировали противоопухолевую активность КС с помощью МТТ-теста.

Результаты и их обсуждение. Выделенные МСК имели фибробластоподобную морфологию и обладали способностью к длительной пролиферации *in vitro* (7–8 пассажей), а также экспрессировали маркеры стволовой мезенхимной клетки, такие как CD44 (97.8%), CD73 (99.4%), CD90 (93.4%), CD29 (96.5%), CD166 (86.2%) и не экспрессировали маркеры гемопоэтических клеток. Было показано, что жизнеспособность SH-SY5Y после инкубации с КС загруженных МСК, снизилась на 20% по сравнению с

контрольными клетками в обычной культуральной среде и клетками в КС от нативных МСК.

Выводы. Таким образом, показано, что в нетоксичной концентрации 5 мкг/мл CDDP была отмечена противоопухолевая активность загруженных МСК, в отношении опухолевых клеток SH-SY5Y *in vitro*. Полученные результаты будут использованы в дальнейшем для разработки методов терапии онкологических заболеваний с использованием загруженных МСК.

Работа поддержана Программой повышения конкурентоспособности КФУ и грантом РФФИ № 18-34-00738.

Литература

1. Whiteside T.L.: The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth // *Oncogene*. 2008, vol.27, no.45, pp.5904–5912.
2. Nils H.N., Lopez Perez R., Rühle A., Trinh T., Sisombath S., Weber K.-J., Ho A.D., Debus J., Saffrich R., Huber P.E.: Mesenchymal stem cells maintain their defining stem cell characteristics after treatment with cisplatin // *Sci. Rep.* 2016, vol.6, no.20035.
3. Harder H.C., Rosenberg B.: Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells *in vitro* // *International Journal of Cancer*. 1970, vol.6, pp.207–216.

Роль гиалуроновой кислоты в нейросетевой активности гиппокампа на 26 день *in vitro*

Ткаченко Н.М., Гладков А.В., Мухина И.В.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой трёхмерную макромолекулярную сеть, в которой матричные компоненты связываются друг с другом через рецепторы адгезии клеток образуют сложную сеть (Karamanos, 2012). ВКМ выполняет множество функций, начиная от поддержки миграции клеток и регуляции синаптической передачи до активной модуляции нервной ткани после повреждения. ВКМ – это высокодинамичная структурная сеть, которая постоянно подвергается ремоделированию, опосредованной несколькими ферментами, разрушающими матрикс, в нормальных и патологических условиях (Mukhina et al., 2012). Во взрослом мозге матрикс представлен в межклеточном пространстве между нейронами и глиальными клетками, а также в виде перинеурональной сети на самих клетках. В связи с важной ролью внеклеточного компонента мозга в функционировании нервной ткани, исследование физиологической роли различных молекул матрикса является одним из перспективных направлений в науке о мозге.

В предварительных исследованиях (Vedunova et al., 2013) было показано, что при разрушении гиалуронидазой перинеурональных сетей происходит изменение нативной электрофизиологической активности нейронных сетей первичной культуры клеток гиппокампа на 17-й день развития *in vitro*, что выражалось в появлении эпилептоподобной активности с длительностью синхронной активности клеток в составе нейронной сети 30–35 с, а также появлением тонических аудиогенных судорог у мышей раннего постнатального периода (P17).

Поскольку явление гиалуронидаза-зависимой эпилептоформной активности наблюдалось как *in vitro*, так и *in vivo* в раннем постнатальном периоде, предположили, что выявленный феномен связан с возрастными изменениями процесса нейрогенеза при разрушении ВКМ. В связи с чем была поставлена цель – изучить последствия разрушения ВКМ в зрелых культурах диссоциированных клеток гиппокампа мыши. Было показано, что через 2 часа после воздействия гиалуронидазы в зрелой первичной культуре клеток гиппокампа (26 день развития *in vitro*) возникает временное уменьшение количества сетевых пачек и рассинхронизация сетевой активности с увеличением количества отдельных спайков. Через 24 часа после добавления гиалуронидазы, сетевая активность повышается за счёт увеличения количества коротких сетевых пачек импульсов, растёт синхронизация активности с максимальным увеличением синхронизации к 31 дню развития культуры (5 день после добавления гиалуронидазы). К 45 дню развития *in vitro* сетевая активность нормализуется до начальной. Таким образом, при однократном добавлении гиалуронидазы на 26 день развития культуры клеток гиппокампа мыши, возникает временное измене-

ние биоэлектрической активности, которое затем возвращается в исходное состояние (до добавления гиалуронидазы) с изменениями биоэлектрической активности, характерными при старении клеточной культуры. Таким образом, имеет место возраст-зависимое изменение сетевой активности при разрушении гиалуроновой кислоты ВКМ, наиболее выраженное в раннем постнатальном нейрогенезе.

Литература

1. Karamanos N.K.: Extracellular matrix. Pathobiology and signaling: Walter de Gruyter; Berlin, 2012, pp.197–208.
2. Mukhina I.V., Korotchenko S.A., Dityatev A.E.: Extracellular matrix molecules, their receptors, and extracellular proteases as synaptic plasticity modulators // *Neurochem. J.* 2012, vol.6, no.2, pp.89–99.
3. Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E., Perminova M., Pimashkin A., Zakharov Yu., Dityatev A., Mukhina I.: Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2013, no.149(8), doi:10.3389/fncel.2013.00149.

Влияние интервальной гипоксии на двигательную активность крыс после моделирования ишемии головного мозга

Токальчик Ю.П.

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Одной из важнейших проблем современной медицины является рост количества случаев ишемии головного мозга. Поэтому ведётся поиск способов профилактики данных патологий. Гипоксическое прекондиционирование является одним из способов нейропротекции, однако механизмы данного эффекта полностью не изучены. Целью данной работы явилась выявление влияния прекондиционирования на двигательно-ориентировочную активность крыс после моделирования гипобарической гипоксии или двусторонней окклюзии общих сонных артерий. Также, оценивали активность нейрогенеза в области гиппокампа этих животных.

Материалы и методы. Для проведения исследования сформировали четыре экспериментальные группы. Группа 1 – крысы, которым моделировали гипоксию путём дозированного удаления воздуха из герметичного сосуда ($n = 7$); группа 2 – крысы, которым моделировали гипоксию путём дозированного удаления воздуха из герметичного сосуда после прекондиционирования ($n = 7$); группа 3 – крысы, которым перевязывали обе сонные артерии ($n = 5$); группа 4 – крысы, которым перевязывали обе сонные артерии после прекондиционирования ($n = 5$). Прекондиционирование (2 мин, 60 кПа) проводили в течение четырёх дней до моделирования острой гипобарической гипоксии (10 мин, 100 кПа) или двусторонней перевязки общих сонных артерий. Первый раз двигательно-ориентировочную активность оценивали в приподнятом крестообразном лабиринте у всех крыс за две недели до экспериментальных воздействий. Второе измерение в группах 1 и 2 проводили сразу после моделирования острой гипоксии. В группах 3 и 4 – на следующие сутки после двухсторонней окклюзии сонных артерий. Для визуализации распределения стволовых клеток головной мозг крыс из каждой группы выделяли на следующие сутки после моделирования острой гипоксии или двухсторонней окклюзии сонных артерий. Срезы головного мозга маркировали с помощью моноклональных антител к CD90, конъюгированных с FITC (Sigma-Aldrich, США). Полученные данные обрабатывали методом Манна-Уитни и представляли в виде среднего значения \pm ошибка среднего.

Результаты и их обсуждение. Для того чтобы оценить деструктивное воздействие гипоксии на функциональное состояние головного мозга, у животных определяли параметры ориентировочно-двигательной активности в приподнятом крестообразном лабиринте. В группах 1, 3 и 4 пройденная дистанция и количество пересечений центрального сектора значительно снизилось после моделирования ишемии по сравнению с исходным уровнем. У животных из группы 2 данные параметры изменились не так

сильно (отмечена тенденция к снижению общей дистанции и количества пересечений центральной зоны). Аналогичные изменения выявили при оценке средней скорости и времени подвижности. Анализ максимальной скорости показал значимое снижение данного параметра у крыс, которым перевязывали сонные артерии с двух сторон. У животных из других групп не отмечено изменений уровня максимальной скорости после моделирования гипоксии. Изменение времени замирания коррелирует с уровнем тревожности у животных, поэтому значительное увеличение данного параметра, которое отмечено в группах 3 и 4, свидетельствует о нежелательных последствиях гипоксии, вызванной двухсторонней окклюзией общих сонных артерий. Анализ параметров вертикализации продемонстрировал позитивный эффект прекондиционирования у крыс, которым моделировали острую гипобарическую гипоксию (группа 2). У животных из этой группы отмечена тенденция к снижению количества вертикальных стоек, в то время как в других группах данный показатель значимо снизился. Время вертикализации в группе 2 как до моделирования гипоксии, так и после него оставалось на одном уровне. В других группах период пребывания животных в вертикальном положении после моделирования гипоксии был значительно ниже по сравнению с исходными значениями.

При анализе распределения эндогенных стволовых клеток в области гиппокампа у крыс, которым проводили прекондиционирование, выявлено увеличение количества флуоресцирующих клеток в рассматриваемом участке по сравнению группами без прекондиционирования. Этот эффект наблюдали вне зависимости от типа воздействия. В группе 1 отмечено 4.9 ± 0.5 клеток в поле зрения. На срезах мозга крыс из группы 2 количество клеток составило 15.1 ± 1.4 клеток ($p \leq 0.05$), что значимо превышало этот параметр в группе 1. Такая же тенденция наблюдалась у крыс с окклюзией сонных артерий. После прекондиционирования (16.5 ± 1.9 клеток, $p \leq 0.05$) на срезах мозга крыс наблюдали значимо больше клеток, чем без прекондиционирования (6.4 ± 1.0 клеток).

Выводы. Воздействие гипоксического стимула на подпороговом уровне (прекондиционирование) сопровождается увеличением количества стволовых клеток в области гиппокампа крыс. Это указывает на активацию нейрогенеза, что увеличивает адаптационные способности крыс в ответ на надпороговое травмирующее воздействие (острая гипобарическая гипоксия, перевязка сонных артерий).

Нейропротекторные эффекты лактата и пирувата в клеточных моделях болезни Паркинсона

Федотова Е.И., Бережнов А.В.

Институт биофизики клетки, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний. В его основе – селективная гибель дофаминергических нейронов в среднем мозге. В качестве одной из причин гибели клеток рассматривается возникновение нарушений в процессе утилизации поврежденных митохондрий (митофагии). Несмотря на возросший интерес, механизмы активации и регуляции mitoфагии в настоящее время плохо изучены. Ранее нами было показано, что закисление цитозоля клеток нигерицином и протонофором FCCP вызывает активацию мито- и аутофагии в культурах клеток, в том числе в клеточных моделях наследственных форм БП. Однако указанные воздействия, наряду с активацией МФ оказывали значительное токсическое действие на клетки. В настоящей работе мы провели поиск нетоксичных воздействий, способных активировать mitoфагию в культуре клеток и протестировали их на токсической модели БП.

Нами было показано, что лактат и пируват (в виде натриевых солей) в концентрациях порядка десятков миллимолей вызывает закисление внутриклеточной среды, сравнимое по амплитуде с действием 10 мкмоль FCCP. Также было показано, что при 24-часовой инкубации лактат натрия и пируват натрия не вызывают гибели клеток, не влияют на уровень NADH и митохондриальный потенциал, при этом стимулируют mitoфагию (в т.ч. по PINK/Parkin-независимому пути).

На следующем этапе мы проводили эксперименты на токсической модели БП. Для этого, мы инкубировали клетки нейробластомы SH-SY5Y и культуры гиппокампа крысы с 500 мкмоль MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) в течение 24 часов, после этого в среду добавляли 10 ммоль лактата натрия или пирувата натрия ещё на 24 ч. При этом натриевые соли лактата и пирувата значительно сокращают MPP⁺-индуцированную гибель клеток, хотя эффект в клетках нейробластомы был менее выражен, чем в культуре клеток мозга.

Защитное действие лактата и пирувата может быть связано с частичным восстановлением энергетики митохондрий, нарушенной в моделях БП. Для того, что оценить уровень деполяризации митохондрий, мы прокрашивали клетки Rhodamine 123 и измеряли амплитуду ответа на 1 мкмоль FCCP. Нами было показано, что 24-часовая инкубация клеток с MPP⁺ приводит к значительному снижению потенциала митохондрий, а при 48-часовом воздействии в нейроглиальной культуре FCCP уже не может вызвать заметных изменений флуоресценции Rhodamine 123. Как в клетках мозга, так и в клетках SH-SY5Y применение 10 ммоль лактата натрия или пирувата натрия значительно увеличивало амплитуду сигнала в ответ на FCCP. Это

свидетельствует в пользу того, что лактат и пируват (с несколько меньшей эффективностью) восстанавливают митохондриальный потенциал, сниженный MPP+, либо предотвращают его падение.

Для того чтобы оценить, способны ли лактат и пируват натрия активировать митофагию в токсической модели, мы исследовали степень колокализации митохондрий и лизосом в культурах, прокрашенных MitoTrackerGreen и LysoTrackerRed. Было показано, что MPP+ приводит к увеличению колокализации митохондрий и лизосом как в культуре SH-SY5Y, так и в нейроглиальных культурах крысы. А натриевые соли лактата и пирувата, добавленные на фоне MPP+, дополнительно увеличивают колокализацию, что свидетельствует об активации митофагии.

Методом ПЦР анализа мы оценили изменение уровня экспрессии генов, контролирующих процессы ауто/митофагии в клетках нейробластомы при 24-часовом воздействии пирувата натрия (10 ммоль), лактата натрия (10 ммоль) совместно с MPP+ (500 мкмоль). При инкубации клеток с пируватом натрия и MPP+ наблюдается значительное усиление экспрессии LC3, Mfn-1, p62, NDP52, Vnpr3, Parkin. А при воздействии лактата натрия с MPP+ значительно возрастает уровень мРНК генов Ndp52, Opteneurin, Vnpr3, Parkin. Исходя из полученных данных, можно предположить, что при длительном воздействии пируват натрия и лактат натрия в концентрации 10 ммоль совместно с 500 мкмоль MPP+ способны стимулировать процесс ауто/митофагии.

Результаты, полученные методом вестерн-блот анализа, согласуются с данными, полученными методом ПЦР анализа, согласно которым в клетках, обработанных MPP+ и пируватом натрия и лактатом натрия, не происходит значительного увеличения экспрессии белка BNIP3L. А уровни экспрессии белков LC3B и SQSTM1/p62, которые отвечают за формирование аутофагосомы, увеличиваются.

Таким образом, в экспериментах, проведённых на токсических моделях БП, было показано, что лактат и пируват в форме натриевых солей в концентрации 10 ммоль активируют митофагию и аутофагию, частично восстанавливают биоэнергетику митохондрий и защищают клетки от гибели.

Экспрессия транспортного белка GAT-1 в респираторном ядре (комплекс Бетцингера) в ранний постнатальный период в норме и при пренатальном дефиците серотонина

Хожай Л.И.

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

Установлено, что классические нейротрансмиттеры серотонин и (5-hydroxytryptamine; 5-НТ) и γ -аминомасляная кислота (ГАМК) контролируют многочисленные физиологические функции. Изменения баланса уровней этих соединений в мозге приводит к развитию ряда нейропатологий. В центральной нервной системе у млекопитающих и человека ГАМК является основным тормозным синаптическим нейротрансмиттером, при этом GAT-1 считается одним из основных транспортеров ГАМК и относится к Na^+ -зависимым нейротрансмиттерным белкам обратного захвата, локализованных на плазматической мембране нейронов и глии. Функция транспортера состоит в обратном захвате нейротрансмиттера из синаптической щели или межклеточного пространства обратно в пресинаптическую терминаль, при этом эффективность нейротрансмиттерной передачи определяется скоростью обратного захвата медиатора. Показано, что становление дыхательной системы у млекопитающих происходит во время первых трёх постнатальных недель. Установлено, что последовательная смена фаз респираторного цикла осуществляется бульбоспинальными нейронами комплекса Бетцингера, которая регулируется различными моноаминами, среди которых важными являются ГАМК и серотонин, последний, в свою очередь, модулирует тормозные эффекты ГАМК. Изменение баланса уровней этих нейрохимических соединений может приводить к нарушению респираторной функции, развитию апноэ, брадипноэ, синдрому внезапной детской смерти и т.п. В настоящее время данных о динамике экспрессии GAT-1 в комплексе Бетцингера в ранний неонатальный период и её зависимости от эндогенного уровня серотонина в литературе нет. В связи с этим целью работы явилось исследование экспрессии GAT-1 на ранних постнатальных сроках в норме и при пренатальном дефиците серотонина. Работа выполнена на крысах линии Wistar. Для снижения уровня эндогенного серотонина в пренатальный период использовали метод ингибирования триптофангидроксилазы (фермента его синтеза) пара-хлорфенилаланином (пХФА) (Sigma, США). Головной мозг у родившихся крысят исследовали на 5, 9 и 20 постнатальные сутки. Иммуоцитохимическую реакцию на выявление GAT-1 проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA transporter 1/ GAT-1) (AbCam, Великобритания). Для оценки оптической плотности продукта реакции в цитоплазме нейронов и нейропиле использовали изображения, полученные с помощью цифровой видеокамеры, и программное обеспечение ВидеоТест Мастер Морфология (ООО «Видео Тест», Санкт-Петербург). Данные обрабатывали, вычисляя среднее арифметическое значение, и ошибку среднего значения, стати-

стическую обработку проводили средствами анализа ANOVA (Statistica 7.0, Statsoft Inc., США) с достоверностью различий при $p < 0.05$. Было показано, что у контрольных крыс в комплексе Бетцингера на всех исследованных сроках выявляется сеть отростков и терминалей в нейропиле и синаптические структуры иммуноположительные на GAT-1. На второй постнатальной неделе значения оптической плотности иммуноокрашивания продукта реакции снижаются (примерно в 2 раза) как в терминалях, так и синаптических структурах. К концу третьей недели эти значения вновь повышаются и примерно соответствуют их уровню на ранних сроках развития, при этом значительно увеличивается численность синаптических структур, содержащих GAT-1. У животных, развивавшихся в условиях пренатального дефицита серотонина, в комплексе Бетцингера на всех сроках исследования было выявлено увеличение (в 1.6–2 раза) значений оптической плотности иммуноокрашивания продукта реакции как в отростках в нейропиле, так и синаптических структурах по сравнению с таковыми в контроле. На второй постнатальной неделе отмечено достоверное снижение значений оптической плотности иммуноокрашивания, а к концу третьей недели имело место повышение этих значений вновь.

Таким образом, снижение уровня эндогенного серотонина в пренатальный период (когда формируются как ГАМКергическая, так и серотонинергическая системы) приводит к увеличению экспрессии транспортного белка GAT-1 в респираторном ядре, что, несомненно, будет влиять на регуляцию функций тормозного нейротрансмиттера. Выявленное отклонение в экспрессии GAT-1 может приводить к развитию респираторной дисфункции, а процесс экспрессии GAT-1 может быть мишенью для фармакологической коррекции тормозных эффектов. Полученные результаты будут способствовать пониманию механизмов регуляции экспрессии GAT-1, его высвобождения и интернализации при формировании респираторных патологий.

Особенности флуротил-индуцированной эпилепсии у крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией

Чернова К.А., Бурханова Г.Ф., Ситдикова Г.Ф., Герасимова Е.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Гипергомоцистеинемия является независимым фактором риска развития сосудистых и микроваскулярных нарушений, приводящих к цереброваскулярной дисфункции (Clarke et al., 1998; Riggs et al., 1996). В клинике было показано, что у детей с врождённой и приобретённой гипергомоцистеинемией могут развиваться острые неврологические отклонения, такие как судороги и психоз (Mudd et al., 1985; Quinn et al., 1997). Гомоцистеин и его метаболиты действуют как агонисты ионотропных (Lipton et al., 1997), так и метаботропных глутаматных рецепторов (Shi et al., 2003). Изменение физиологического паттерна активности нейрональных сетей в онтогенезе приводит к возникновению гипервозбудимости нервных клеток и синхронизации генерации потенциалов действия в различных отделах мозга (Filatov et al., 2011; Sander, 2003), что может приводить к развитию эпилепсии.

В связи с этим целью нашей работы было исследование влияния флуротил-индуцированной эпилептической активности у новорожденных крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на новорожденных крысах линии Wistar возрастом 8–12 постнатальных дней. Были сформированы 2 группы животных: 1 – контрольная группа (уровень Гц в плазме 5.9 ± 0.5 мкмоль); 2 – гомоцистеиновая (ГГЦ) группа – животные с пренатальной гипергомоцистеинемией (уровень Гц в плазме 22.1 ± 1.5 мкмоль). В первой серии эксперимента крысят обеих групп помещали в воздухопроницаемую камеру для видеорегистрации поведения (30 мин), далее в камеру впрыскивали 100 мкл флуротила, который испаряясь, образовывал судорожные пары. Видеорегистрация длилась 2 часа. Оценивали латентный период и тип возникающей активности в баллах по шкале Расина с небольшими модификациями для новорожденных животных (Racine, 1978). Во второй серии эксперимента проводили регистрацию ЭЭГ активности у животных обеих групп с помощью многоканальных электродов (Neuronexus) в области гиппокампа (зона CA1) (латерально 2.2 мм, каудально 2 мм от брегмы). Сигналы усиливались и фильтровались при 0–9 кГц усилителем DigitalLynx (Neuralynx, Монтана, США). Для индуцирования судорожной активности на нос животного в пластиковой маске подавали флуротил (0.1 мл) в течение 2 минут. Анализировали амплитуду, частоту и длительность эпилептических разрядов, а также частоту множественных потенциалов действия (МнПД) до и после эпилепсии. Статистический анализ проводился с использованием критерия Манна-Уитни и критерия Вилкоксона ($p < 0.05$). Расчёт проводился с помощью программ OriginPro 8.5 и IBM SPSS Statistics 21.

Результаты. Мониторинг активности у животных при действии флуротила показал, что только у 66% животных интенсивность судорог в контрольной группе достигала 4–5 баллов по шкале Расина, тогда как в ГГц группе эти показатели наблюдались у 100% животных. При этом у некоторых ГГц группы не фиксировались слабые типы судорожной активности, а сразу появлялась более сильная, тогда как большинство животных контрольной группы проходили начальные стадии развития судорог (1 и 2 баллы по Расину). Латентный период до начала первых судорог в контрольной группе ($n = 6$) составил 33.8 ± 3.8 с, а в ГГц группе ($n = 6$) – 20.1 ± 3.6 с ($p < 0.05$). Таким образом, развитие флуротил-индуцированных судорог у группы ГГц проходило быстрее и интенсивнее, чем у животных контрольной группы.

Флуротил в течение 5–10 секунд вызывал, как моторные, так и электрографические судороги в виде высокоамплитудных спайк-волновых (СВ) комплексов (Holmes et al., 1998; Huang et al., 1999). У контрольной группы амплитуда СВ комплексов была выше, чем у ГГц группы и составила 1.8 ± 0.07 мВ ($n = 6$) и 2.93 ± 0.16 мВ ($n = 6$) ($p < 0.05$), соответственно. При этом частота и длительность СВ комплексов в ГГц группе была ниже, чем в контрольной и составила: частота – 15.5 ± 0.67 1/с (Контрольная группа) и 9.75 ± 0.65 1/с (ГГц группа) ($p < 0.05$); длительность – 438 ± 121 с (Контрольная группа) и 245 ± 26 с (ГГц группа) ($p < 0.05$). Фоновая частота МнПД у животных контрольной группы (1.82 ± 0.35 1/с) была ниже, чем у ГГц группы (3.72 ± 0.28 1/с) ($p < 0.05$). После аппликации флуротила и возникновения эпилептической активности частота МнПД резко падала в обеих группах, через 15–20 минут в контроле возвращалась к исходному уровню (1.47 ± 0.31 1/с), тогда как в ГГц группе подобного восстановления не наблюдалось (1.69 ± 0.58 1/с).

Таким образом, можно предположить, что возбудимость головного мозга у животных с пренатальной гипергомоцистеинемией выше, чем у здоровых животных. На это указывает высокая фоновая частота МнПД и высокая чувствительность к флуротилу – быстрое развитие тонико-клонических судорог и формирование высокоамплитудных спайк-волновых комплексов у животных с высоким уровнем гомоцистеина.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 18-015-00423.

Анализ взаимодействия мезенхимных стволовых клеток со сверхэкспрессией фосфатазы PTEN и клеток нейробластомы человека при совместном культивировании *in vitro*

Чулпанова Д.С., Соловьева В.В., Ризванов А.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Введение. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают иммунологической инертностью и естественным тропизмом к опухолевым нишам, что делает их перспективными векторами для целевой доставки противоопухолевых агентов, в частности генов-онкосупрессоров (Chulpanova et al., 2018). Одним из таких генов-онкосупрессоров является фосфатаза с двойной субстратной специфичностью PTEN, который играет важную роль в развитии опухолевых клеток. В ряде работ фосфатаза доставлялась непосредственно к опухолевым клеткам и вводилась внутрь клеток с помощью цинковых наночастиц (El Sharkawi et al., 2017) или липосом (Altinoğlu et al., 2016), что приводило к снижению пролиферативной активности и индукции апоптоза опухолевых клеток *in vitro*.

Материалы и методы. В настоящей работе МСК человека были выделены из жировой ткани и трансдуцированы рекомбинантным лентивирусом, кодирующим кДНК гена PTEN (МСК-PTEN) или генов дальнего красного флуоресцентного белка Katushka-2S (МСК-Katushka-2S). Трансдуцированные МСК отбирали путём селекции с использованием антибиотика бластицидина S (5 мкг/мл) в течение 10 дней. Сверхэкспрессия PTEN была подтверждена ПЦР в режиме реального времени и вестерн-блот анализом. Экспрессия дальнего красного флуоресцентного белка Katushka-2S оценивалась с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager.Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Для оценки влияния нативных и генетически модифицированных МСК на пролиферативную активность клеток нейробластомы человека, опухолевые клетки SH-SY5Y культивировались совместно с нативными МСК, МСК-Katushka-2S или МСК-PTEN в соотношении 1:1 в течение 72 часов. После чего жизнеспособность общей ко-культуры оценивалась с использованием набора для анализа пролиферации клеток CellTiter 96 AQueous (Promega, США), согласно инструкции производителя. Поглощение в лунках определяли с использованием Infinite M200Pro (Tecan Trading AG, Швейцария) в двухволновом режиме: фильтр 490 нм в качестве основного и фильтр 630 нм в качестве эталонной длины волны. Число апоптотических и некротических клеток SH-SY5Y после совместного культивирования с нативными МСК, МСК-Katushka-2S или МСК-PTEN определяли с использованием набора для детекции апоптоза APC Annexin V с PI (Sony Biotechnology, США) в соответствии с протоколом производителя на приборе FACSAria III (BD Bioscience, США).

Результаты. Пролиферативная активность общей культуры клеток SH-SY5Y с клетками МСК-PTEN снизилась на 15% по сравнению с пролиферативной активностью ко-культуры SH-SY5Y с нативными МСК и на

21% по сравнению с ко-культурой МСК-Katushka-2S. Число живых клеток SH-SY5Y было существенно ниже ($80.8 \pm 2.68\%$) после культивирования с клетками МСК-PTEN по сравнению с клетками, которые культивировались с нативными МСК ($89.65 \pm 1.06\%$) и МСК-Katushka-2S ($86.25 \pm 1.90\%$).

Из полученных данных можно сделать вывод, что использование МСК-PTEN может быть эффективно в терапии онкологических заболеваний нервной системы, в частности для лечения нейробластомы человека. Однако, требуются дальнейшие исследования эффективности МСК-PTEN на животных моделях опухолей *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 18-74-10044 и Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

Литература

1. Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., Tazetdinova L.G., James V., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V.: Application of mesenchymal stem cells for therapeutic agent delivery in anti-tumor treatment // *Frontiers in Pharmacology*. 2018, vol.9, Art. ID 259.
2. El Sharkawi F., Ewais S., Fahmy R., Rashed L.: PTEN and TRAIL genes-loaded zein nanoparticles as potential therapy for hepatocellular carcinoma // *J. Drug. Target*. 2017, vol.25, no.6, pp.513–522.
3. Altinoğlu S., Wang M., Li K., Li Y., Xu Q.: Intracellular delivery of the PTEN protein using cationic lipidoids for cancer therapy // *Biomater. Sci*. 2016, vol.4, no.12, pp.1773–1780.

Разработка и анализ функциональности плазмидной генотерапевтической конструкции, кодирующей гексозаминидазу А, для терапии болезни Тея-Сакса

Шаймарданова А.А., Чулпанова Д.С., Соловьева В.В., Ризванов А.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Введение. Болезнь Тея-Сакса (англ. Tay-Sachs disease, TSD, OMIM 272800) относится к группе лизосомных болезней накопления и наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Частота встречаемости данного заболевания 1 на 320 тыс. новорожденных (частота носителей 1 на 250) (Lew et al., 2015). Данное заболевание характеризуется недостаточностью фермента β -гексозаминидазы А (HexA) вследствие различных мутаций в гене α -субъединицы данного фермента (HEXA), в результате чего происходит накопление GM2 ганглиозидов внутри лизосом преимущественно нервных клеток (Myerowitz, 1997). При болезни Тея-Сакса наблюдается острая нейродегенерация, которой предшествует экспансия активированной микроглии, активация макрофагов и астроцитов с образованием воспалительных медиаторов. Характерными особенностями болезни Тея-Сакса являются мышечная слабость, атаксия и другие проблемы с движением, речевые проблемы и психические расстройства. В настоящее время лечение болезни Тея-Сакса сводится к облегчению симптомов, а в случае поздних форм болезни к задержке её развития. Тяжесть клинических признаков при данном заболевании зависит от остаточной активности HexA, возникающей при некоторых мутациях. Для достижения терапевтического эффекта при лечении TSD необходима продукция и распределение недостающего фермента HexA в ЦНС (Solovyeva et al., 2018).

Материалы и методы. В настоящей работе был разработан экспрессионный плазмидный лентивирусный вектор pLX303, содержащий кДНК гена HEXA. Клонирование гена из донорной плазмиды в целевой вектор pLX303 (AddGene) проводили путём LR-рекомбинации. Правильность сборки генетической конструкции проверяли рестрикционным анализом. Полученной плазмидной конструкцией проведена генетическая модификация клеток HEK293T. В качестве контроля была использована плазмидная конструкция pLX303-Katushka2S, экспрессирующая красный флуоресцентный белок. Через 48 часов после трансфекции собирали конденсированную среду для анализа ферментативной активности, а также модифицированные клетки сняли раствором трипсина для вестерн-блот анализа. Иммуноблоттинг проводили по системе Лаэмли (Laemmli) в денатурирующих условиях (SDS-PAGE). Для определения ферментативной активности α субъединицы HexA использовали флуоресцентный субстрат 3.2 ммоль MUGS (Lot# 7-EQJ-32-3 TRC Canada). Субстрат заранее растворили в цитратно-фосфатном буфере pH = 4.2. Инкубировали 1 час при 37°C. Реакцию останавливали добавлением глицин-карбонатного буфера (0.17 моль глицин, 0.17 моль карбонат

натрия). Уровень флуоресценции измеряли с помощью спектрофотометра TECAN (excitation 365 нм, emission 450 нм).

Выводы. В клетках, модифицированных плазмидой, кодирующей ген HEXA, активность α -субъединицы фермента HexA выше в 10 раз сравнительно с контролем. Вестерн-блот анализ показал наличие выраженной полосы, соответствующей ожидаемой молекулярной массе α -субъединицы фермента HexA в генетически модифицированных клетках. Таким образом, доказана экспрессия и функциональная активность α -субъединицы фермента HexA в клетках, модифицированных плазмидой, содержащей кДНК гена HEXA. Разработанная плазмидная конструкция может стать основой для создания новых методов генной и генно-клеточной терапии болезни Тея-Сакса.

Литература

1. Lew R.M., Burnett L., Proos A.L., Delatycki M.B.: Tay-Sachs disease: current perspectives from Australia // *Appl. Clin. Genet.* 2015, no.8, pp.19–25.
2. Myerowitz R.: Tay-Sachs disease-causing mutations and neutral polymorphisms in the Hex A gene // *Hum. Mutat.* 1997, no.9(3), pp.195–208.
3. Solovyeva V.V., Shaimardanova A.A., Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., Chakrabarti L., Rizvanov A.A.: New approaches to Tay-Sachs disease therapy // *Frontiers in physiology.* 2018, vol.9:1663. doi:10.3389/fphys.2018.01663.

Механизмы генерации тканевой компоненты внутреннего оптического сигнала в соматосенсорной коре новорожденных крыс *in vivo*

Шарипзянова Л.¹, Сучков Д.¹, Minlebaev M.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² INMED-INSERM U901, University Aix-Marseille II, Marseille, France

Внутренний оптический сигнал (ВОС) широко используется для функционального картирования в центральной нервной системы как в клинических, так и в фундаментальных исследованиях. Во взрослом мозге ВОС формируется в основном за счёт гемодинамической составляющей, связанной с изменением локального кровотока и соотношения окси/дезоксигемоглобина в активном нейрональном участке. В развивающейся нервной системе генерация ВОС главным образом обусловлена тканевой компонентой, связанной с изменением светопрозрачности нейрональной ткани. В то время как в препаратах *in vitro*, во взрослом мозге, было продемонстрировано, что тканевая компонента ВОС связана с отеком клетки, из-за накопления хлора и воды в клетке во время её активности, остаётся вопрос, является ли нарушения водно-хлорного гомеостаза механизмом, лежащим в основе тканевой компоненты ВОС в развивающемся мозге.

С целью ответить на этот вопрос, нами была разработана перфузионная камера, которая позволяла проводить регистрацию ВОС с одновременной аппликацией и последующей отмывкой фармакологических веществ с поверхности неокортекса. Эксперименты проводились на соматосенсорном неокортексе новорожденных крысят возраста от 4 до 7 дней после рождения. Для исследования роли водно-хлорного гомеостаза модулировалась активность основных хлорных котранспортеров (NKCC1 и KCC2), для чего использовались их ингибиторы (буметанид и фуросемид).

Результаты показали, что ингибирование хлорного котранспортера NKCC1 путём введения в перфузионную камеру буметанида (20 мкмоль) незначительно влияло на ВОС (средняя амплитуда ВОС в контроле $0.22 \pm 0.098\%$, на фоне буметанида $0.18 \pm 0.08\%$, $n = 11$). Однако введение фуросемида в концентрации, избирательно блокирующей KCC2 (2 мкмоль), значительно изменяло амплитудно-временные параметры ВОС. Наблюдалось снижение амплитуды ВОС (для амплитуды ВОС от $0.25 \pm 0.028\%$ до $0.157 \pm 0.037\%$, $p < 0.05$, для времени полуспада амплитуды ВОС наблюдалось недостоверное снижение от 15.2 ± 3.74 с до 12.45 ± 4.57 с, $p > 0.05$, $n = 8$).

Нами продемонстрировано, что нарушение работы хлорного котранспортера – KCC2, участвующего в удалении анионов хлора из клетки, значительно влияло на генерацию ВОС. Можно предположить, что, так же как и во взрослом мозге, основным механизмом лежащим в основе тканевой компоненты ВОС в незрелой ЦНС лежит увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-10174 и в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

Митохондрия-эндоплазматические контакты диссоциированных клеток при воздействии острой нормобарической гипоксии *in vitro*

Широкова О.М.¹, Мищенко Т.А.^{1,2}, Мухина И.В.^{1,2}, Ведунова М.В.²

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Исследования гипоксического воздействия на митохондрию нейронов проводятся в течении десятилетий, однако для правильной интерпретации результатов, следует учитывать морфо-функциональные взаимодействия митохондрий с другими органеллами клеток. Известно, что митохондрии являются высоко подвижными органеллами, функционально и морфологически взаимодействующие с ядерной мембраной, эндоплазматическим ретикуломом и плазмоллемой клетки. Целью работы являлось изучение ультраструктурных особенностей митохондрия-эндоплазматических контактов (МЭРК) и межмитохондриальных контактов (ММК) в структурных отделах нейронов при гипоксическом воздействии *in vitro* и при хроническом воздействии нейротрофического фактора головного мозга (BDNF).

Объектом исследования служили первичные культуры гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей. Острую нормобарическую гипоксию моделировали на 21 день культивирования диссоциированных клеток гиппокампа путём замены культуральной среды на среду с низким уровнем содержания кислорода в течение 10 минут. Добавление нейротрофического фактора головного мозга в концентрациях 1 нг/мл производилось ежедневно, начиная с 3 дня развития клеточных культур клеток гиппокампа. Фиксацию клеточных культур проводили через 24 часа после реоксигенации. Ультраструктурный анализ проводили с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Ультратонкие срезы получали на ультратоме Leica EM UC7 (Leica, Германия), анализировались на электронном микроскопе Morgagni 268D (FIE, Нидерланды), морфометрический анализ осуществлялся с использованием программного обеспечения ImageJ.

Острое кислородное голодание *in vitro* приводит к увеличению количества митохондрий, связанных с ЭР во всех структурных частях нейронов. Наиболее выраженные изменения наблюдались в телах нейронов. Данный параметр сохраняется на исходном уровне в группе с хроническим добавлением нейротрофического фактора. В интактной группе внутри аксональных отростков меньшее количество (на 20%) МЭРК по сравнению с телами нейронов. Гипоксическое воздействие вызывало незначительное увеличение количества МЭРК в аксонах. Несмотря на то, что в телах нейронов после нормобарической гипоксии на 21 день культивирования количество МЭРК возрастает, их протяженность в группе «Нормоксия» значительно выше, чем в группе «Гипоксия». Снижение протяженности в нейрональных отростках статистически не достоверно. Добавление нейротрофического фактора BDNF

не сохраняет нативными митохондрия-эндоплазматические контакты, т.е. при сохранении количества контактов, поверхность взаимодействия между органеллами уменьшается. Обратная ситуация наблюдается в дендритных отростках: на фоне уменьшения количества МЭРК в дендритных отростках, их протяженность статистически достоверно возрастает в группе с хроническим применением нейротрофина.

Таким образом, митохондрия-эндоплазматические контакты в различных частях нейронов обладают различной чувствительностью к кислородному голоданию, и по-разному реагируют на хроническое введение нейротрофического фактора BDNF.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (гранты № 18-34-00877, 17-04-01128, 18-015-00391, 18-315-20003), гранта Президента РФ МК-1485.2019.4, а также при поддержке государственного задания (проекты 17.3335.2017/4.6 и 6.6379.2017/8.9).

Ultrastructural and functional mitochondrial changes induced by oxygen-glucose deprivation in the rat barrel cortex *in vitro*

Juzekaeva E.R.¹, Arkhipova S.S.², Sofronova S.A.², Mukhtarov M.R.¹, Khazipov R.N.^{1,3}

¹ Laboratory of Neurobiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

³ INMED-INSERM U901, University Aix-Marseille II, Marseille, France

Mitochondrial dysfunction is one of the key mechanisms of neuronal death during cerebral ischemia. Therefore we explored ultrastructural and functional mitochondrial changes induced by oxygen-glucose deprivation (OGD) in slices of the rat barrel cortex *in vitro*. Oxygen/glucose deprivation (OGD) was induced by superfusion with ACSF in which N₂ replaced O₂ and sucrose replaced glucose at equimolar concentration. Anoxic depolarization (AD) is a hallmark of ischemic brain damage. In slices of the rat barrel cortex ischemia-like conditions induced by oxygen-glucose deprivation (OGD) evoke AD which manifests as a negative LFP shift and an increase in light transmittance. In the present study using simultaneous extracellular local field potential (LFP), optical intrinsic signal (OIS) we tracked the OGD-induced AD in slices of the rat barrel cortex. Electron microscopy was performed in brain slices which experienced thirty minutes of OGD. Ultrastructural neuronal damage was overall similar to that observed in the ischemic brain tissue *in vivo*, although the level of edema, which manifested by formation of large clear intracellular spaces was more prominent in the post-OGD slices. Compared to control slices, which displayed normal appearance of mitochondria, post-OGD slices showed prominent alterations in mitochondrial structure. Neuronal mitochondria displayed increase in size, electron transparent matrix and expanded cristae. Mitochondria of swollen dendrites in the post-OGD tissue were larger and had an irregular or toroidal shape indicating a disconnection of the electron transport chain; they also displayed expanded cristae. However, part of dendrites were not swollen in the post-OGD tissue, and their mitochondria displayed less prominent changes: they were larger in size and displayed condensed cristae but maintained round shape, which could indicate their adaptation to survival. Along with these findings, post-OGD slices also displayed poor staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, a marker of mitochondrial function. Thus, OGD induces ultrastructural and functional mitochondrial impairments in brain slices *in vitro*. This model could be useful for exploration of the mechanisms of ischemia-induced of mitochondrial damage and their roles in neuronal death.

This work was supported by RSF (17-15-01271) and performed in the framework of the Program of competitive growth of Kazan Federal University.

Развитие нейроваскулярного взаимодействия в соматосенсорном неокортексе новорожденных крыс

Ямолдин А.А.¹, Сучков Д.С.¹, Кульмаметьева А.Р.¹, Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² INMED-INSERM U901, University Aix-Marseille II, Marseille, France

Одним из методов нейровизуализации, широко используемых в фундаментальной науке и клинических исследованиях, является методика регистрации внутреннего оптического сигнала (ВОС). Данный метод позволяет с высокой точностью определять местоположение активной нейрональной ткани, являясь аналогом более дорогих методов исследования, таких как функциональная магнитно-резонансная томография и позитронно-эмиссионная томография.

Природа ВОС базируется на трёх механизмах: тканевой, гемодинамической и гемоваскулярной. Активное состояние нейрональной ткани сопровождается изменением её светорассеивания, что лежит в основе тканевой компоненты ВОС. Кроме этого нейронная активность сопровождается увеличением потребности нейрональной ткани в кислороде, что приводит к изменению соотношений оксигенированной и дезоксигенированной форм гемоглобина в окружающих активный нейрональный участок сосудах. Динамические изменения соотношения окси/дезоксигемоглобина формируют гемодинамическую компоненту ВОС. Как следствие, необходимость в большом количестве кислорода влечет за собой изменения в притоке крови к активному участку, то есть расширение сосудов. Изменения объёмов локального кровотока формирует третий механизм ВОС, так называемую гемоваскулярную компоненту. Ранее было показано, что в отличие от взрослого мозга, где ВОС преимущественно базируется на гемодинамических и гемоваскулярных изменениях в активном кортикальном участке, в развивающейся центральной нервной системе тканевая компонента играет ключевую роль в генерации ВОС, что связано с незрелостью нейроваскулярного взаимодействия во время раннего постнатального периода. Временная задержка в усилении кровоснабжения активных нейрональных участков у животных менее 2-х недель после рождения уже была продемонстрирована ранее, но вопрос о возрастном и пространственном профиле развития нейроваскулярного взаимодействия остаётся открытым до сих пор.

Мы предприняли попытку ответить на этот вопрос используя модель соматосенсорной коры новорожденной крысы *in vivo*. В течение первых двух послеродовых недель у новорожденных крысят мы охарактеризовывали изменения гемодинамики и светорассеивания в активной нейрональной ткани и в окружающих её участках. Регистрация ВОС производилась с использованием трёх длин волн света: 528 нм (зелёный), 625 нм (красный), 850 нм (инфракрасный), что являлось необходимым условием для оценки вклада различных механизмов ВОС в его генерацию. Анализировались амплитудно-временные параметры, такие как время нарастания сигнала, время полуспада и амплитуда. Нами также оценивалась площадь вызванного ВОС на разных длинах волн.

Нами был проведён ряд экспериментов по исследованию размеров кортикальных участков, вовлечённых в вызванный сенсорной стимуляцией ответ. Кортикальный ответ записывался с использованием методик регистрации ВОС и ЭЭГ. В ходе экспериментов было показано, что в бочонковой коре вызванная сенсорной стимуляцией осцилляторная электрическая активность сопровождалась ВОС, наблюдаемым в ИК спектре. Однако, время возникновения ВОС в зелёном спектре запаздывало в сравнении с временем возникновения ЭЭГ сигнала. В ходе взросления крысенка наблюдалось прогрессирующее уменьшение временной задержки между вызванной электрической активностью и гемодинамическим ВОС ответом с 1.5 ± 0.7 с на P6–P7 до 0.2 ± 0.2 с на P14–P15 (P0 – день рождения грызуна). Более того, мы обнаружили наличие ВОС зарегистрированного в зелёном и красном спектрах в областях вокруг бочонковой коры. Этот ВОС характеризовался временной задержкой относительно ВОС наблюдаемого в бочонковой коре. Дальнейший анализ также продемонстрировал уменьшение временной задержки между ВОС в активной и окружающей нейрональной тканях в ходе взросления крысы. Таким образом, незрелость нейроваскулярного взаимодействия наблюдаемая во время раннего постнатального периода, проявляется не только задержкой гемодинамического и гемоваскулярного ответов, но и в захватывании обширных территорий, существенно больших, чем размер активной нейрональной ткани.

Работа выполнялась при поддержке гранта РНФ № 16-15-10174.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

Секция

«Развитие нейробиологии:
новые представления и методы»

Исследование уровня окислительного стресса при различных моделях сахарного диабета у мышей

Альбова П.Е., Березин С.Р., Калигин М.С., Яковлева О.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Сахарный диабет (СД) – группа эндокринных заболеваний, характеризующихся хронической гипергликемией, возникающей вследствие относительного или абсолютного дефицита инсулина. При повышенной концентрации глюкозы в крови создаются идеальные условия для развития окислительного стресса, который является основой для развития осложнений при СД (Черданцев и др., 2010). У больных СД 1 типа установлено снижение содержания восстановленного глутатиона и глутатион-пероксидазной активности как в плазме, так и в эритроцитах (Колесниченко и др., 2009). Поэтому мы анализировали содержание малонового диальдегида – показателя перекисного окисления липидов и активность глутатионпероксидазы – одного из ферментов восстанавливающих окисленную форму глутатиона в мозге и мышцах ног мышей с аллоксановым и стрептозоциновым СД.

Было сформировано 3 группы животных: 1) контрольная – животные находящиеся в стандартных условиях животника и стандартном рационе, 2) с аллоксановой моделью СД – животные получившие внутривенный укол аллоксана (250 мг/кг) после суточного голодания, 3) с стрептозоциновой моделью СД – животные получившие укол стрептозоцина (100 мг/кг) после суточного голодания. Животные с концентрацией глюкозы выше 9 ммоль/л выводились из опыта, предварительно анестезировались с помощью 5% изофлурана (Abbott Laboratories, США) в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (24 ноября 1986 года; 86/609/ЕЕС). Концентрацию глюкозы в крови производили глюкометром «Ассу-Чек Active» (Германия).

Концентрацию малонового диальдегида определяли в 10% гомогенатах тканей по реакции с 40% трихлоруксусной кислотой и 0.75% тиобарбитуровой кислотой. После 30 минут нагрева на водяной бане (95°C), измеряли оптическую плотность продуктов реакции на спектрофотометре ПЭ9600 (Экрос, Россия) при длине волны 532 нм.

Активность фермента глутатионпероксидазы (ГП) определяли по величине убыли восстановленного глутатиона в среде инкубации при восстановлении гидроперекисей. Определение концентрации глутатиона определяли по реакции с реактивом Элмана (500 мкмоль). Полученные продукты спектрофотометрировали при длине волны 412 нм.

Концентрация малонового диальдегида составила для контрольной группы в гомогенатах тканей мозга 0.209 ± 0.021 мкмоль, в гомогенатах тканей мышц задних конечностей 0.191 ± 0.015 мкмоль ($n = 13$). У животных с различными моделями СД наблюдалось увеличение концентрации малонового диальдегида в гомогенатах тканей. Наибольшие изменения мы наблюдали у животных с стрептозоциновой моделью СД: в гомогенатах тканей мозга 0.525 ± 0.057 мкмоль ($n = 14$, $p < 0.05$), и в гомогенатах тка-

ней мышц задних конечностей 0.480 ± 0.042 мкмоль ($n = 14$, $p < 0.05$). И в меньшей степени при аллоксановой модели СД: в гомогенатах тканей мозга 0.302 ± 0.032 мкмоль ($n = 12$, $p < 0.05$), и в гомогенатах тканей мышц задних конечностей 0.311 ± 0.029 мкмоль ($n = 12$, $p < 0.05$).

Исследование активности ГП показало, что в гомогенатах тканей мозга контрольной группы активность фермента составила 0.472 ± 0.071 мкмоль/мл/мин ($n = 24$), в гомогенатах тканей мышц задних конечностей 0.357 ± 0.042 мкмоль/мл/мин ($n = 21$). У животных с различными моделями СД наблюдалось снижение активности ГП в гомогенатах тканей. Наибольшие изменения мы наблюдали у животных с стрептозоциновой моделью СД: в гомогенатах тканей мозга 0.258 ± 0.055 мкмоль/мл/мин ($n = 21$, $p < 0.05$) и в гомогенатах тканей мышц задних конечностей 0.187 ± 0.019 мкмоль/мл/мин ($n = 21$, $p < 0.05$). И в меньшей степени при аллоксановой модели СД: в гомогенатах тканей мозга 0.284 ± 0.056 мкмоль/мл/мин ($n = 21$, $p < 0.05$) и в гомогенатах тканей мышц задних конечностей 0.244 ± 0.021 мкмоль/мл/мин ($n = 21$, $p > 0.05$).

Нами наблюдается усиление перекислого окисления липидов и снижение активности ГП, что несёт тканеспецифичный характер. При морфологическом исследовании поджелудочной железы нами показано, что после введения аллоксана количество инсулин-позитивных клеток в островках снизилось до 65%, а после введения стрептозоцина до 35%, что объясняет выраженность перекислого окисления липидов и активности ГП при стрептозоциновой модели СД.

Таким образом, нами показано, что у мышей с аллоксановым и стрептозоциновым СД наблюдается напряжение антиоксидантной защиты.

Изменения в цитокиновом профиле супернатантов микроглии при разной степени травмы спинного мозга

Ахметзянова Э.Р.¹, Журавлева М.Н.¹, Мухамедшина Я.О.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Травма спинного мозга – одна из актуальных медицинских проблем, решение которой на сегодняшний день стоит под вопросом. Перспективным направлением исследований в данной области является изучение роли клеток микроглии в посттравматических процессах. Клетки микроглии – это резидентные макрофаги центральной нервной системы (ЦНС), первыми отвечающие на инфекции и повреждения выделением специфических протеаз, цитокинов и нейротрофинов. При этом, эффект, оказываемый микроглией, может быть как позитивным, так и негативным в зависимости от фенотипа. Микроглия является крайне пластичным типом клеток, способным сдвигать фенотип в сторону про- или противовоспалительного в зависимости от микроокружения. Расшифровка поведения микроглии потенциально способна открыть пути для замедления нейродегенеративных процессов в центральной нервной системе. В связи с этим, целью нашей работы является выявление изменений в цитокиновом профиле микроглии, в зависимости от тяжести и сроков травмы спинного мозга крысы.

Для моделирования травмы спинного мозга использовались самки крыс породы Wistar весом 250–300 г. Крыс глубоко анестезировали путём внутрибрюшинного введения хлоралгидрата (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г, Sigma). После осуществления ламинэктомии, всем экспериментальным животным была нанесена травма спинного мозга различной степени тяжести: слабая – 1,5 м/с (n = 20), средняя – 2,5 м/с (n = 20) и ияжёлая – 4 м/с (n = 20) при помощи импактора Leica Impact One for Reproducible Neurotrauma. После операции крысы получали дозы гентамицина (25 мг/кг, Омела, Российская Федерация) внутримышечно в течение семи дней подряд. Спустя 3, 7, 14 и 60 суток после операции, крыс наркотизировали хлоралгидратом с последующим получением фрагмента спинного мозга размером 5 мм из области травмы. Полученную ткань гомогенизировали со средой DMEM/F12 для получения гомогенатов ткани спинного мозга.

Клетки микроглии были получены из коры головного мозга новорожденных 3х дневных крысят породы Wistar. Для получения клеток микроглии из суспензии смешанных клеток, применялось центрифугирование в градиенте плотности OptiPrep. После получения микроглии, её отмывали и культивировали на среде DMEM/F12 с добавлением сыворотки и пенициллина-стрептомицина. Для моделирования травмы спинного мозга *in vitro*, нативную микроглию культивировали 4 суток до прикрепления клеток к культуральному пластику. Гомогенаты ткани травмированного спинного мозга различной степени тяжести, полученные на 3, 7, 14 и 60 сутки после травмы были добавлены в культуру 4х дневной микроглии в концентрации 500 мкг/мл. Спустя 3 суток культивирования с гомогенатами,

супернатанты культивируемых клеток забирались для мультиплексного анализа.

Для характеристики цитокинового профиля супернатантов культивируемой при разных условиях микроглии, использовался мультиплексный анализ по технологии xMAP Luminex с использованием набора Bio-Plex Pro Rat Cytokine 23-Plex Immunoassay для анализа содержания 23 цитокинов и хемокинов: G-CSF, GM-CSF, GRO/KC, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, IL-18, M-CSF, MCP-1, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF- α , VEGF. Показано, что концентрация противовоспалительного цитокина TNF- α была минимальной на модели слабой и тяжёлой степени травмы на 60 сутки и на 3 сутки на модели средней тяжести. При этом, при культивировании с интактным гомогенатом, уровень данного цитокина был равен среднему показателю всех исследуемых групп. Любопытные результаты получены для молекулы-активатора клеток микроглии IFN γ : максимальная концентрация показана при культивировании микроглии с интактным гомогенатом, а минимальная – в контрольной группе с культивированием микроглии без добавления гомогенатов в течение 7 суток и в контрольной среде. В то же время, внутри отдельных групп резких скачков концентрации IFN γ не наблюдалось. Ещё одна молекула-активатор клеток микроглии, MCP-1, показала достаточно высокую концентрацию при культивировании с интактным гомогенатом, которая оказалась в 2 раза выше показателя для контрольной группы. Внутри групп со слабой, средней и тяжёлой степенью травмы данный показатель всегда оказывался на минимальном уровне на 60 сутки. Для остальных исследуемых цитокинов, концентрация в отдельных группах заметно не менялась.

Таким образом, при моделировании травмы спинного мозга *in vitro* наблюдаются достоверные изменения в содержании некоторых цитокинов и хемокинов, которые в сочетании с результатами других исследований позволят выявить потенциальные маркеры для оценки степени повреждения ЦНС. В дальнейшем, такие сведения будут способствовать развитию персонализированного подхода к лечению пациентов с травматической болезнью спинного мозга.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00141.

Воздействие разных концентрации серотонина и адреналина на миокард правого желудочков сердца крыс линии вистар в хроническом эксперименте

Ахметова М.Ж.¹, Нигматуллина Р.Р.², Миндубаева Ф.А.¹

¹ Карагандинский медицинский университет, Караганда, Республика Казахстан

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Актуальность: В последнее время большое внимание уделяется изучению серотонинэргической системы. Серотонин (5-гидрокситриптами́н), выполняя функции нейротрансмиттера и тканевого гормона, участвует в формировании и регуляции различных физиологических параметров организма в норме и при патологии, играя важную роль в поддержании гомеостаза. Характеризуя широкий спектр биологического действия серотонина, следует отметить, что он модулирует процессы высшей нервной деятельности, вызывает сокращение гладкой мускулатуры бронхов, кишечника, сосудов, оказывает выраженное влияние на миокард и другие органы и системы организма. Интересен тот факт, что первое сокращение сердца у эмбрионов вызывает серотонин. Серотонин и адреналин представляют собой гуморальную систему регуляторов и модуляторов физиологических процессов, которые в условиях патологии превращаются в факторы, способствующие развитию заболевания. Однако несмотря на имеющиеся экспериментальные данные в этой области, свидетельствующие о важности роли ионов Ca^{+} , протеинкиназ, АФК в сигнальных и метаболических путях эндотелиальных и гладкомышечных клетках, нам пока ещё слабо известно динамика происходящих процессов и взаимодействие сигнальных систем, определяющих сосудистый тонус при их взаимодействиях.

Цель исследования. Провести сравнительный анализ влияния больших и малых доз серотонина и адреналина на правый желудочек крыс. В экспериментах использовали самцов белых лабораторных крыс линии Вистар, которые содержались в виварии кафедры нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета.

Материалы и методы исследования. На установке Power Lab, датчик силы MLT 050/D *in vitro* проводились эксперименты по определению инотропной функции миокарда крыс. У предварительно наркотизированных уретаном (800 мг/кг) крыс извлекали сердце и помещали в чашку Петри с окисигенированным рабочим раствором. Из миокарда правого желудочка препарировали полоски длиной 2–3 мм и диаметром 0.8–1 мм. Препарат фиксировали вертикально одним концом к датчику силы, другим – к точке опоры, затем каждый препарат погружали в отдельный резервуар с рабочим раствором, объёмом 25 мл, в которые подавали рабочий раствор температуры 280°C. Состав рабочего раствора на 400 мл дистиллированной воды (гр.): NaCl – 3.2, KCl – 0.12, CaCl₂ – 0.12, MgCl₂ – 0.05, NaHPO₄ – 0.016, аскорбиновая кислота – 0.01972, глюкоза – 0.8 Показатели фиксировали при помощи программного обеспечения Chart 4.0. Реакцию силы сокращения рассчитывали в процентах от исходного показателя (до введения

0.1 мкмоль/л). Статистическую обработку производили с определением M , m и δ ; достоверность различий рассчитывали по t-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение. В результате данного эксперимента, с увеличением каждой концентраций, серотонин оказывал дозозависимое положительное инотропное действие на миокард правых желудочков крыс. Однако с увеличением концентраций адреналина положительный инотропный эффект ослабевал. При введении максимальной концентраций 10 мкмоль/л, адреналин оказывал отрицательный инотропный эффект. Мы предполагаем, что это связано с большой нагрузкой на желудочки крыс который начинает угнетать миокард. Подобная реакция может быть связана с активацией бета2-адренорецепторов, которые частично реализуют свой эффект через ингибиторный G белок. Однако такой эффект происходит при сердечной недостаточности, когда сердце является не здоровым. Также полагают, что активация пресинаптических альфа 2 адренорецепторов уменьшают выделение норадреналина из синапсов и тем самым снижают силу сердечных сокращений.

Молекулярные механизмы развития атрофических процессов в постуральных и локомоторных мышцах при ограничении двигательной активности

Белова С.П., Мочалова Е.П., Тыганов С.А., Шенкман Б.С.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

В условиях космического полёта отсутствует нагрузка на постуральные мышцы. Было показано, что крысы, подвергшиеся космическому полёту, проявляют определённые структурно-метаболические изменения в мышцах задних конечностей (Desplanches, 1997; Ilyin and Oganov, 1989). Большой объём данных получен в отношении *m. soleus*, основной тонической антигравитационной мышцы. Однако в работе Козловской И.Б. и соавторов было показано, что макаки в условиях космического полёта при нахождении в капсуле демонстрируют значительное снижение размеров волокон локомоторной мышцы *m. vastus lateralis*, которое также наблюдалось и при нахождении животных в этой капсуле на земле. Из чего следует, что этот эффект связан не только с невесомостью, но и с ограничением двигательной активности в космической капсуле, в то время как размеры волокон медленной *m. soleus* снижались только при полёте (Belozeroва, 2003; Shenkman, 2003). В изоляционных экспериментах «MARS500» было показано, что ограничение двигательной активности в большей степени влияет на быстрые мышцы, чем на медленные (Fomina, 2017).

В литературе практически нет данных о сигнальных событиях, происходящих при развитии атрофических процессов в быстрых мышцах при ограничении двигательной активности. Целью работы было исследование ключевых сигнальных маркеров катаболических (экспрессия E3-убиквитинлигаз; транскрипционные факторы, регулирующие их экспрессию) и анаболических (Akt-mTOR-p70S6k) сигнальных путей в быстрых и медленных мышцах при развитии атрофических процессов при ограничении двигательной активности.

Самцы крыс Wistar с массой тела примерно 180–220 г были распределены в контрольную группу и группу с ограничением двигательной активности. Контрольные животные содержались в клетках нормального размера (30.0×40.0 см, 34 см высотой), в то время как крысы группы с ограничением двигательной активности содержались в маленьких клетках (17.0×9.6 см и 13.0 см в высоту) в течение 21 дня (Ishihara, 2016). Была исследована быстрая локомоторная мышца *m. plantaris* и медленная постуральная *m. soleus*.

Методом ПЦР в реальном времени были получены данные по экспрессии ключевых в протеолитическом процессе E3-лигаз MuRF-1 и MAFbx. Содержание ключевых анаболических маркеров pAkt, p-P70S6k, pP90RSK, p4E-BP, GSK3 β были оценены методом электрофореза с последующим вестерн-блоттингом. Также в работе были измерены механические параметры

сокращения изолированных мышц *m. plantaris* и *m. soleus*: максимальная сила изометрического и эксцентрического сокращения, пассивная жесткость мышцы. Выявлены особенности развития атрофических процессов в постуральных и локомоторных мышцах при ограничении двигательной активности.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00074А.

Динамика экспрессии мРНК ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α в вентральном и дорсальном гиппокампе крыс в первые две недели после черепно-мозговой травмы

Бутузов А.В., Комольцев И.Г., Волобуева М.Н., Третьякова Л.В., Квичанский А.А.

Научные руководители: Гуляева Н.В., Большаков А.П.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Введение. На сегодняшний день патогенез коморбидных черепно-мозговой травме (ЧМТ) заболеваний, таких как депрессия, когнитивные нарушения и посттравматическая эпилепсия, изучен мало. Эти состояния тесно связаны с дистантным повреждением гиппокампа в результате ЧМТ. На данный момент в литературе отсутствуют данные о локализации и молекулярных характеристиках дистантного повреждения в функционально-различных дорсальной и вентральной частях гиппокампа. Изучение механизмов дистантного повреждения гиппокампа поможет найти новые подходы к диагностике и предотвращению осложнений после ЧМТ.

Цель исследования. Оценка динамики уровня экспрессии мРНК ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α в вентральном и дорсальном гиппокампе крыс в первые две недели после ЧМТ.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на самцах крыс линии Wistar ($n = 33$ в группе ЧМТ, $n = 39$ в группе ложнооперированных животных (ЛО) и $n = 9$ в группе чистого контроля). ЧМТ моделировали путём дозированного латерального гидродинамического удара (около 3 атм) в область сенсомоторной коры справа. Крыс разделили на 4 группы и выводили из эксперимента путём декапитации на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки после нанесения травмы. Из отпрепарированных структур гиппокампа (правый и левый дорсальный, правый и левый вентральный гиппокампы) выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию с последующим ПЦР в реальном времени, определяли уровень экспрессии ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α .

Результаты. Экспрессия мРНК ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α в дорсальном и вентральном гиппокампах ипсилатерального полушария и в дорсальном гиппокампе контралатерального полушария на 1-е сутки после ЧМТ была в несколько раз выше, чем уровень экспрессии мРНК этих цитокинов у крыс группы ЛО ($p < 0.05$). Снижение экспрессии мРНК ИЛ-6 до уровня, наблюдаемого у животных групп ЛО, происходило к 3-м суткам, снижение экспрессии мРНК ИЛ-1 β и ФНО α – к 14-м суткам после ЧМТ.

Выводы. В остром периоде после ЧМТ у крыс происходит выраженное повышение экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов в вентральном и дорсальном ипсилатеральном гиппокампе и умеренное повышение экспрессии мРНК этих цитокинов в дорсальном контралатеральном гиппокампе. Эта реакция наиболее выражена на 1-е сутки после ЧМТ и постепенно спадает к 14-м суткам. Получены новые данные о характере

и локализации раннего дистантного повреждения в гиппокампе крыс после ЧМТ. Изменения могут играть важную роль в развитии осложнений после ЧМТ, таких как депрессия, тревожные и когнитивные нарушения, и посттравматическая эпилепсия.

Поддержано грантом РФФИ № 18-315-00146.

Повышение уровней кортикостерона и провоспалительных цитокинов в крови и гиппокампе крыс в первые две недели после черепно-мозговой травмы

Волкова А.А., Комольцев И.Г., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В.
Научный руководитель: Гуляева Н.В.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

В патогенезе черепно-мозговой травмы (ЧМТ) неразрывно связаны нейровоспаление и стресс. В ответ на острое повреждение в коре и в гиппокампе происходит экспрессия про- и противовоспалительных цитокинов. Стресс, испытываемый непосредственно в момент травмы, приводит к активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС). Её эффекты реализуются в гиппокампе благодаря повышенной плотности рецепторов к кортикостерону. Вероятно, это способствует хронизации нейровоспаления и утяжеляет исход травмы, увеличивая риск развития ПТЭ, депрессии и нейроэндокринных нарушений (Rowe et al., 2016). Взаимодействие про- и противовоспалительных систем в патогенезе ЧМТ на данный момент представляется нам недостаточно изученным.

Целью данной работы является оценка динамики уровня цитокинов и кортикостерона в крови и гиппокампе крыс в первые две недели после ЧМТ. Работа выполнена на 81 самце крыс линии Wistar: крысы с ЧМТ ($n = 33$), ложнооперированные (ЛО, $n = 39$) и группа контроля (К, $n = 9$). Отверстие диаметром 3 мм в черепе крыс групп ЧМТ и ЛО было сделано краниотомически в области правой сенсомоторной коры. После выхода из наркоза крысам группы ЧМТ наносили латеральный гидродинамический удар силой около 3 атм в свободном поведении. Животных выводили из эксперимента путём декапитации на 1 сутки (ЧМТ, $n = 9$, ЛО, $n=10$), 3 сутки (ЧМТ, $n = 7$, ЛО, $n = 9$), 7 сутки (ЧМТ, $n = 8$, ЛО, $n = 11$) и 14 сутки (ЧМТ, $n = 9$, ЛО, $n = 9$) после краниотомии. Проводили сбор декапитационной крови, выделяли отделы гиппокампа (правый и левый дорсальный; правый и левый вентральный гиппокампы). С помощью ИФА определяли уровни кортикостерона (КС), ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α в крови и гиппокампе на 4 временных точках. Сравнение проводили между группами К, ЛО и ЧМТ на 4 временных точках методом ANOVA.

Уровень КС в крови повышен на 1, 3 и 14 сутки после ЧМТ ($p > 0.05$), а в гиппокампе – только на 3 сутки после ЧМТ ($p > 0.05$).

Уровень ИЛ-6 в крови повышен на 1, 3 и 14 сутки. Уровень ФНО α в крови повышен только на 1 сутки после ЧМТ.

Уровень ИЛ-1 β крови повышен на 1 и 7 сутки.

Уровень ИЛ-1 β в гиппокампе повышен на 1 и 14 сутки, а ИЛ-6 – на 7 сутки ($p > 0.05$).

Таким образом, уровень КС в гиппокампе повышен на 3 сутки, а ИЛ-6 – на 7 сутки, тогда как в крови их уровни повышены на 1, 3 и 14

сутки после ЧМТ. Данные изменения могут отражать этапность иммунных и эндокринных нарушений после ЧМТ и свидетельствовать о сочетанном влиянии интерлейкинов и кортикостерона на течение процессов нейровоспаления.

Поддержано грантом РФФИ № 18-315-00146.

Протеогликаны поверхностного компартмента нейронов при травме спинного мозга

Кабдеш И.М.¹, Повышева Т.В.^{2,3}, Мухамедшина Я.О.^{1,2}, Челышев Ю.А.²

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

³ Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова,
Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Травма спинного мозга (ТСМ) приводит к выраженному очаговому повреждению ткани с последующим образованием глиального рубца, который блокирует регенерацию и рост аксонов. Изменения на клеточном уровне и состав внеклеточного матрикса (ВКМ) в местах, удаленных от области травмы, остаются мало охарактеризованными на данный момент. В настоящем исследовании в морфологически сохранной ткани, прилежащей к области повреждения спинного мозга, были обнаружены выраженные изменения в экспрессии протеогликанов поверхностного компартмента нейронов на 30 сутки после ТСМ. Эти изменения были связаны с реактивными астроцитами и снижением в них уровня основного переносчика глутамата 1 (GLT-1). В ходе работы была установлена динамика экспрессии протеогликанов на разных сроках ТСМ в областях вблизи нейронов и на удалении от них. Также показано, что уровни лектиканов и хондроитинсульфат протеогликана 4 (CSPG4) увеличиваются после ТСМ, и большинство CSPG4 связаны с астроцитами в зависимости от близости к мотонейронам IX пластинки передних рогов спинного мозга. Таким образом, ТСМ вызывает широко распространенные изменения в спинном мозге, которые могут быть ответственны за дисфункцию нейронов вдали от поврежденной области и дальнейшее ухудшение течения посттравматических процессов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00018.

Восприятие звуковых последовательностей с локальной и глобальной нерегулярностями в третьей стадии сна

Левкович К.М.¹, Украинцева Ю.В.¹, Шилов М.О.^{1,2}, Мартынова О.В.¹

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

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

Вопрос восприятия и обработки информации во время разных стадий сна остаётся по-прежнему актуальным. Особенно, неизученными остаются границы внимания во время сна. Для решения этой задачи можно применить регистрацию вызванных потенциалов (ВП) в ответ на звуковые последовательности local/global парадигмы, основная цель которой разграничить уровни внимания: низкий, или неосознанный, и высокий, осознанный и направленный (Bekinschtein et al., 2009).

Данная парадигма состоит из последовательностей звуков, организованных так, что в их следовании выявляются два типа нерегулярностей: локальная либо глобальная. Так в случае локальной нерегулярности среди пачек с одинаковыми звуками – стандартами – (ссссс – 80% времени) иногда появляются пачки с девиантным звуком на конце (ссссд – 20%), и для детекции таких отличающихся звуков достаточно низкого уровня внимания. Глобальная нерегулярность соответствует изменению паттернов стимулов (ссссд – 80% и ссссс – 20%), и для её детекции необходим высокий уровень внимания.

Восприятие каждой нерегулярности ассоциировано со специфическими компонентами ВП: негативность рассогласования (НР), P3a и P3b. НР отражает механизмы распознавания разницы между текущим стимулом и предыдущим, не требующие направленного внимания (Näätänen et al., 1972). Он регистрируется в ответ на локальную нерегулярность (~120–250 мс) у людей в 1 и 2 стадиях сна, парадоксальном сне, но с редуцированной формой пиков ВП (Strauss et al., 2015). Компонент P3a (~120–250 мс) связан с процессом непроизвольного переключения внимания при неосознанном определении разницы между предъявляемыми стимулами (Alho et al., 1998). НР и P3a отражают бессознательную оценку статистической нерегулярности (Naccache et al., 2015). В то время как компонент P3b (~300–700 мс) отражает сознательную оценку статистической нерегулярности (Naccache et al., 2015). Компонент P3b отсутствует у людей, которые в сознании, но рассеяны (Bekinschtein et al., 2009), различают стимулы наугад (Picton, 1992), и не регистрируется в ответ на глобальную нерегулярность в первой (после засыпания), второй стадиях сна и в парадоксальном сне (Strauss et al., 2015).

Ранее не было исследовано восприятие звуковых последовательностей с локальными и глобальными нерегулярностями во время третьей стадии сна. В нашем исследовании мы предъявляли последовательности звуков с локальными и глобальными нерегулярностями во время третьей стадии сна и при пассивном прослушивании в бодрствовании после сна. Мы предполагали, что НР и P3a останутся во время третьей стадии сна, но

они будут иметь редуцированную форму в отличие от бодрствования. Компонент P3b должен отсутствовать и в третьей стадии и в пассивном бодрствовании, но мы хотели сравнить два состояния, чтобы проверить есть ли между ними разница.

В нашем исследовании приняли участие 14 здоровых добровольцев (22.5 ± 2.5 , 9 женщин). Во время сна и при пассивном прослушивании в бодрствовании им предъявлялись последовательности с локальными и глобальными нерегулярностями. Характеристики звуков и интервалов: стандарт – 500-1000-1500 Гц; девиант – 505-1010-1515 Гц; громкость – 40 дБ; длительность одного звука – 50 мс (включая 5 мс время подъёма и спада), интервал между стимулами – 100 мс; интервал между пачкам звуков – 1400 ± 50 мс. Длительность каждой последовательности была 4 минуты. Обе последовательности состояли из 120 стандартов и 30 девиантов, но первые 10 звуков всегда были стандартными. Запись ЭЭГ (по международной системе 10-20) и четырёх каналов окулограммы для отслеживания вертикальных и горизонтальных движений глаз производилась с помощью 19-канального энцефалографа Энцефалан-EEGR-19/26 (фирма «Медиком», Таганрог, Россия) с частотой дискретизации 250 Гц. После обработки данных ЭЭГ в программе BrainVision Analyzer 2.0 (Brain Products GmbH, Германия), мы усреднили ВП по эпохам –800 мс – 600 мс от начала последнего стимула в пачке. Далее мы получили значения амплитуды пика и латентности в окнах ВП для следующих компонентов: НР (120–250 мс); P3a (120–250 мс); P3b (250–500 мс). Данные мы анализируем в программа Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, США).

По предварительным данным когнитивный компонент P3b отсутствует как во время третьей стадии сна, так и при пассивном прослушивании в бодрствовании. НР и P3a присутствуют также во время третьей стадии сна, но с увеличенной латентностью и амплитудой. Анализ данных продолжается.

Исследование проводится при поддержке фонда РФФИ, проект № 17-06-00918-ОГН.

Количественные изменения перинейрональных сетей в развитии и посттравматическом состоянии

Мельникова А.А.¹, Липачев Н.С.², Арнст Н.И.¹, Кочнева А.А.¹, Яаалиноя Х.³, Жигалов А.², Карпова Н.², Кулесская Н.², Мавликеев М.О.¹, Раувала Х.³, Киясов А.П.¹, Павельев М.Н.²

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Центр нейронаук, Университет Хельсинки, Хельсинки, Финляндия

³ Институт биотехнологии, Университет Хельсинки, Хельсинки, Финляндия

Перинейрональная сеть (PNN) – это высоко структурированная часть внеклеточного матрикса ЦНС, регулирующая синаптическую пластичность и широкий спектр патологических состояний, в том числе посттравматическая регенерация и эпилепсия.

В нашей работе мы изучили гистологические срезы, окрашенные агглютинином *Wisteria floribunda* для количественной оценки размера PNN и обогащенность хондроитин сульфатами (ХС) в головном и спинном мозге мыши. Срезы соматосенсорной коры исследованы во время периода образования PNN в 14, 21 и 28 постнатальные дни. Размер PNN одной клетки и насыщенность хондроитин сульфатами были количественно оценены для всех слоёв коры и, особенно, для IV коркового слоя, который имеет самую высокую плотность PNN-позитивных нейронов. Мы показываем, что интенсивность окрашивания хондроитин сульфат протеогликанов (ХСПГ) возрастает между 14 и 28 постнатальными днями, в то время как размер PNN остаётся неизменным. Незрелые PNN демонстрируют узкий пик распределения интенсивности окрашивания ХСПГ, тогда как созревание PNN сопровождается крупным расширением гистограммы распределения интенсивности ХСПГ для PNN единичной клетки в сторону более высоких значений.

Также мы рассмотрели посттравматические изменения экспрессии PNN в 6 и 7 ламинах шейного отдела СМ после гемисекции. Мы показываем повышение содержания ХС на расстоянии 1.6–1.8 мм рострально от места травмы и повышение плотности PNN-содержащих клеток на расстоянии 0.4–1.2 мм каудально от места травмы. Более того, мы показываем снижение площади PNN единичной клетки на расстоянии 200 мкм каудально от места травмы, предполагая, что внеклеточный матрикс перинейрональных сетей принимает участие в перестройке ткани после травмы в СМ. Таким образом, наши результаты демонстрируют новые представления о динамике структуры PNN в развивающейся и посттравматической ЦНС.

Изменение экспрессии мышечноспецифичных E3-убиквитинлигаз в ответ на блокирование работы HDAC1 при функциональной разгрузке постуральных мышц крысы

Мочалова Е.П., Белова С.П., Немировская Т.Л.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Одним из серьёзных последствий таких состояний как гипокинезия и гравитационная разгрузка является скелетно-мышечная атрофия. В ходе атрофии в мышце не только снижается белковый синтез, но также увеличивается распад белка. Значительную роль в реализации распада белка играет убиквитин-протеасомная система, ключевыми компонентами которой являются E3-лигазы. Многими исследователями отмечался пик экспрессии E3-лигаз MuRF1 и MAFbx на 3 сутках функциональной разгрузки, что подтверждалось так же и в работах нашей лаборатории. В недавних исследованиях мы обнаружили, что фосфорилирование транскрипционного фактора FOXO3 и транскрипционных факторов сигнального пути NF-κB не всегда предотвращало повышение экспрессии E3-лигаз MuRF1 и MAFbx тогда как во многих литературных источниках данные пути регуляции принято считать основными. Мы предположили, что в этом процессе на ранних сроках разгрузки могут участвовать и другие механизмы, активирующие работу генов E3-лигаз, и, возможно, не связанных с фосфорилированием/дефосфорилированием их транскрипционных факторов. В литературе существуют данные о том, что гистондеацетилазы могут участвовать в регуляции экспрессии генов. Причём это регулирование может осуществляться как с помощью ограничения транскрипции путём деацетилирования гистонов, так и взаимодействуя с транскрипционными факторами, меняя их статус ацетилирования и влияя тем самым на их работу. Целью нашей работы являлась проверка, контролирует ли HDAC1 работу FOXO3a и экспрессию E3 лигаз (MuRF-1 и MAFbx) при функциональной разгрузке мышц. Для этого крысам на фоне 3х-суточной функциональной разгрузки внутрибрюшинно вводился ингибитор HDAC1 CI-994. Для моделирования функциональной разгрузки использовалась модель вывешивания крыс по Ильину-Новикову в модификации Мори-Холтон. 24 самца крыс линии Вистар (195–215 г) были случайным образом разделены на три группы (n = 8): интактный контроль (С), вывешивание в течение 3 суток (HS) и вывешивание в течение 3 суток с введением ингибитора CI-994 (HS+CI). Содержание ключевых сигнальных белков оценивалось с помощью метода вестерн-блоттинга, уровень мРНК определялся методом RT-PCR.

После трёх суток вывешивания мы проверили действие ингибитора, определив содержание HDAC1 в ядерной фракции: достоверное увеличение содержания HDAC1 наблюдалось только в группе HS, а в группе с введением ингибитора уровень HDAC1 не отличался от контрольного. Корректную работу ингибитора также подтверждает тот факт, что со-

держание ацетилированного на N-терминальном хвосте гистон H3 резко увеличивается его в группе с ингибированием HDAC1 при вывешивании.

В группе HS мы обнаружили статистически значимое снижение индекса массы (вес мышцы нормированный на вес крысы), однако в группе с введением ингибитора подобного снижения не наблюдалось. В обеих вывешенных группах было повышено содержание E3-лигаз MAFbx, и MuRF-1. Однако в группе HS+CI было предотвращено увеличение экспрессии мРНК только MAFbx, тогда как экспрессия MuRF-1 в ней была повышена так же, как и в группе HS. Уровень pAkt и pFOXO3 были снижены в одинаковой степени у обеих вывешенных групп относительно группы контроля ($p < 0.05$).

Вывод: HDAC1 контролирует экспрессию E3-лигазы MAFbx при функциональной разгрузке мышц. Ингибирование HDAC1 снижает скорость развития атрофии. Можно предположить, что контроль экспрессии MAFbx осуществляется с помощью деацетилирования FOXO3.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-15-00062.

Иммунофлуоресцентное исследование дистрофина в *m. soleus* крыс после опорной разгрузки и реадаптации на ранних сроках

Нигметзянов И.Р.¹, Нуруллин Л.Ф.^{1,2}, Тяпкина О.В.^{1,2}, Гусев О.А.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Изучение патогенеза гипогравитационного двигательного синдрома (ГДС), в последнее время связано не только с выявлением механизмов, опосредующих развитие локомоторных расстройств, возникающих в организме млекопитающих и человека, находящихся в условиях реального космического полёта и моделирования его эффектов на Земле, но и направленно на понимание процессов, сопровождающих реадаптацию к нормальным условиям двигательной активности. Показано, что пребывание в условиях опорной разгрузки длительностью 3 недели приводит к атрофии в медленной *m. soleus*, сопровождающейся уменьшением содержания белков цитоскелета и белков связанных с дистрофином (Chopard et al., 2001). Однако, остаётся невыясненным, как ведут себя белки дистрофин-гликопротеинового комплекса на ранних стадиях опорной разгрузки, а также в период реадаптации после опорной разгрузки. В связи с этим целью настоящего исследования явилось иммунофлуоресцентное исследование *m. soleus* крыс, находящихся в условиях антиортостатического вывешивания (АОВ) задних конечностей длительностью 1, 3, 7 суток и после 1-, 3-, 7-суточного периода реадаптации после «вывешивания» с использованием специфичных антител к дистрофину. Эксперименты проводили на половозрелых самцах крыс Вистар (вес 253.3±25.6 г), которых разделили на 7 групп: 1) Контроль; 2) АОВ 1 сутки; 3) АОВ 3 суток; 4) АОВ 7 суток; 5) АОВ 7 суток + Реадаптация 1 сутки; 6) АОВ 7 суток + Реадаптация 3 суток; 7) АОВ 7 суток + Реадаптация 7 суток. Криостатные, поперечные срезы (9 мкм) окрашивали первичными поликлональными антителами к дистрофину (1:250, Abcam Plc, 12 часов, +4°C). Затем использовали вторичные антитела (IgG козьиные против кролика) конъюгированные с флуорохромом Alexa488 (1:1000, Invitrogen). При одинаковых условиях приготовления препаратов интенсивность иммунофлуоресценции в саркомере мышцы оценивали по интенсивности свечения. Было выявлено уменьшение интенсивности свечения, у крыс во всех подопытных группах, начиная с первых суток АОВ, которое оставалось на этом уровне до 7 суток реадаптации. При этом площади поперечного сечения волокон были снижены во всех экспериментальных группах. Таким образом, атрофия *m. soleus* сопровождается уменьшением экспрессии дистрофина, начиная с первых суток опорной разгрузки, и остаётся на этом уровне в период реадаптации животных после опорной разгрузки до 7 суток.

Работа поддержана грантом РФФИ КОМФИ № 17-00-00243.

Иммунофлуоресцентное исследование синаптоподина в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга мышей после опорной разгрузки и реадaptации

Николаева Е.А.¹, Гайчик О.В.¹, Нуруллин Л.Ф.^{1,2}, Тяпкина О.В.^{1,2}

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Синаптоподин – это богатый пролином актин-ассоциированный белок, экспрессируемый в зрелых дендритных шипиках нейронов. Уровень экспрессии синаптоподина увеличивается при длительной стойкой потенциации *in vivo* и коррелирует с ремоделированием цитоскелета дендритных шипиков, которые изменяют свою форму и размер в ответ на изменения синаптической активности. Расширяя наши представления о роли мотонейронов спинного мозга в генезе расстройств, возникающих в организме млекопитающих и человека, находящихся в условиях реального космического полёта и моделирования его эффектов на Земле и продолжая исследования, начало которым было положено под руководством Никольского Евгения Евгеньевича, предполагается выяснить изменяется ли уровень экспрессии синаптоподина в мотонейронах спинного мозга, иннервирующих скелетные мышцы задних конечностей у мышей, находящихся в условиях опорной разгрузки (моделирование гипогравитации) и после 7-суточного периода восстановления и адаптации к нормальным условиям активности мышц. Эксперименты проводили на самцах мышей c57black/6 (вес 28.3±0.6 г), половозрелого возраста. Криостатные, свободно плавающие поперечные срезы (20 мкм) окрашивали первичными поликлональными антителами к синаптоподину (1:100, Santa Cruz Biotechnology, 12 часов, +4°C). Затем использовали вторичные антитела (IgG, бычья против козла) конъюгированные с флуорохромом Texas Red (1:1000, Invitrogen). При одинаковых условиях приготовления препаратов интенсивность иммунофлуоресценции в мотонейронах оценивали по интенсивности свечения. Было выявлено уменьшение интенсивности флуоресценции у мышей после 30 суток «вывешивания». К 7 суткам реадaptации после 30-суточной опорной разгрузки уровень интенсивности флуоресценции не отличался от значений, полученных у мышей после 30-суточной опорной разгрузки. При этом значения флуоресценции и не возвращались к значениям, полученным в группе контрольных животных. Таким образом, уменьшение уровня экспрессии синаптоподина в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга мышей после опорной разгрузки и после периода реадaptации даёт основание заключить, что снижение двигательной активности мышц может приводить к реорганизации цитоскелета дендритных шипиков мотонейронов и способности поддерживать длительную потенциацию при синаптической активности.

Влияние АМПК на инициацию аутофагии в *m. soleus* крысы в условиях гравитационной разгрузки

Парамонова И.И., Вильчинская Н.А., Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Длительное пребывание в условиях реальной или моделируемой невесомости приводит к атрофии постуральных мышц млекопитающих. АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК) – один из важных регуляторов внутриклеточного метаболизма скелетных мышц, который может контролировать процессы синтеза и распада белка. Известно, что активированная АМПК может индуцировать протеолитические процессы в скелетной мышце. В связи с этим цель исследования состояла в оценке влияния АМПК на фосфорилирование ключевого маркера аутофагии протеинкиназы ULK-1 (Unc-51-like autophagy activating kinase 1) в камбаловидной мышце (*m. soleus*) крысы после 14-суточной функциональной разгрузки. Для реализации поставленной цели проводилось 14-суточное антиортостатическое вывешивание задних конечностей крыс Вистар по методике Ильина-Новикова в модификации Морей-Холтон. При этом с 7 по 14 день вывешивания 2 группы животных получали ингибиторы АМПК – Compound C и креатин. Методом гель-электрофореза с последующим иммуноблоттингом был определён уровень фосфорилирования АМПК, её субстрата ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС), маркера аутофагии ULK-1, а также киназы гликогенсинтазы 3-бета (GSK-3 β). После 14-суточного вывешивания наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение уровня фосфорилирования АМПК (Thr172) на 117%, АСС (Ser79) на 143% и ULK-1 (Ser555) на 181% относительно контрольной группы, тогда как фосфорилирование GSK3 β (Ser9) снизилось на 50% по сравнению с контрольными значениями. Введение Compound C или креатина на фоне гравитационной разгрузки предотвратило повышенное фосфорилирование АМПК (Thr172), АСС (Ser79) и ULK-1 (Ser555), но не оказало влияния на фосфорилирование GSK3 β (Ser9).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в условиях гравитационной разгрузки АМПК может активировать процесс аутофагии в *m. soleus* крысы.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ) № 17-75-20152.

Интраназальное введение пэгилированных и акрилоилированных полимеров как носителей для доставки лекарственных веществ в мозг

Порфирьева Н.Н.¹, Мустафин Р.И.¹, Хуторянский В.В.^{1,2}

¹ Институт фармации, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Школа фармации, Университет Рединга, Whiteknights, PO box 224, Рединг, RG66AD, Великобритания

Одной из актуальных проблем фармакотерапии заболеваний мозга является ограничение проникновения целого ряда химических соединений в центральную нервную систему (ЦНС) в результате наличия «гематоэнцефалического» (ГЭБ) и «гематоликворного» барьеров. Однако за последние несколько десятилетий было обнаружено, что вещества способны транспортироваться непосредственно в интерстициальную жидкость головного мозга и спинномозговую жидкость при интраназальном введении. Данное явление обусловлено возможностью обхода ГЭБ, благодаря обонятельному эпителию, единственной точкой соприкосновения ЦНС с окружающей средой. Более того, интраназальное введение лекарственных веществ сокращает время наступления фармакологического эффекта и удобен в применении. Ограничением данного способа введения является относительно небольшой объём введения лекарственного средства и его короткое время удерживания. В настоящее время накоплен опыт получения мукоадгезивных материалов для увеличения времени удерживания лекарственных веществ на различных слизистых оболочках. Одной из недавних разработок в этой области является получение полимеров с усмеленной мукоадгезивной способностью путём введения акрилоилированных групп в качестве усилителей мукоадгезивных характеристик, благодаря их реакции с тиольными группами, присутствующими в муцине.

Улучшение фармакокинетического профиля также наблюдается при модифицировании соединений с помощью ПЭгилирования путём присоединения инертных макромолекул полиэтиленгликоля к мукоадгезивным полимерам.

Широко используемым материалом для доставки лекарственных веществ являются полимеры фармацевтического назначения, под торговой маркой Eudragit®, выпускаемые немецким концерном Evonik Röhm GmbH (ранее Degussa, Röhm Pharma). При этом, улучшение мукоадгезивных характеристик данного типа сополимеров с помощью химических модификаций открывает новые возможности для их дальнейшего применения.

В этой связи в данной работе была предпринята попытка ПЭгилирования сополимера анионного типа Eudragit® L100-55 и акрилоилирования терполимера катионного типа Eudragit® EPO для придания им новых свойств. С помощью методов ИК- и ЯМР-спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии, элементного анализа и турбидиметрии было подтверждено успешное включение акрилоилированных групп в Eudragit® EPO и ПЭгилирование Eudragit® L100-55. Оценка мукоадгезивных свойств полученных конъюгатов была проведена в экспериментах *in vitro*

на слизистой ткани носа овец. В результате было показано увеличение мукоадгезии к слизистым мембранам акрилоилированного Eudragit® EPO и быстрое проникновение ПЭГилированного Eudragit® L100-55 в ткани. Таким образом, данные исследования подтверждают успех использования акрилоилированных и ПЭГилированных соединений полимеров для улучшения доставки лекарств в мозг через слизистую оболочку носа.

Оценка влияния локальной гипотермии на функциональное состояние спинальных двигательных центров через 30 суток после травмы спинного мозга у крыс

Раимова М.В., Лобан Е.Ю., Силантьева Д.И., Балтина Т.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Регистрация мультикомпонентных моторных потенциалов мышц вызванных эпидуральной стимуляцией спинного мозга (ЭпССМ) является относительно новым методом, который может быть использован для оценки состояния спинальных двигательных центров ответственных за восстановление моторной активности после травмы спинного мозга. В данном исследовании был проведён анализ состояния спинальных двигательных центров мышц задней конечности крысы в период восстановления (через 30 суток) после травмы спинного мозга при применении локальной гипотермии спинного мозга с использованием метода регистрации моторных вызванных потенциалов исследуемых мышц.

В экспериментах были использованы половозрелые крысы обоих полов. Контузионную травму производили на уровне 8-9 грудных позвонков по модифицированной методике Аллена. После нанесения травмы животных делили на четыре группы: первая группа животных не получала никаких процедур после травмы, во второй группе животных после нанесения травмы применяли процедуру локальной гипотермии. В третьей группе животных сразу после ламинэктомии была произведена процедура локальной гипотермии без нанесения травмы. На 30 сутки после всех процедур производилась регистрация моторных вызванных потенциалов камбаловидной (КМ), икроножной (ИМ) и передней большеберцовой мышцы (ББМ) в ответ на ЭпССМ. Контролем служили параметры моторных вызванных потенциалов интактных животных.

При сравнении максимальных амплитуд раннего компонента двигательного вызванного ответа КМ, ИМ и ББМ на ЭпССМ достоверных отличий между экспериментальными группами обнаружено не было. Анализ максимальных амплитуд среднего компонента моторного вызванного ответа КМ, ИМ и ББМ на ЭпССМ выявил достоверное снижение максимальной амплитуды среднего компонента вызванного ответа ББМ до $24 \pm 4\%$ ($p < 0.05$) во второй группе животных по сравнению с контрольной группой (100%). Максимальная амплитуда позднего компонента моторного вызванного ответа ББМ также была достоверно снижена до $26 \pm 8\%$ во второй группе животных по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

Анализ латентного периода моторных вызванных ответов КМ, ИМ и ББМ выявил достоверное снижение латентного периода ответов КМ в первой группе животных 2 ± 0.1 мс по сравнению с 2.6 ± 0.1 мс ($p < 0.05$). Снижение латентного периода ответов ИМ наблюдалось как в первой до 2.2 ± 0.1 мс, так и во второй группе животных 2.3 ± 0.1 мс по сравнению с 2.7 ± 0.1 мс в контроле ($p < 0.05$). Латентный период вызванных ответов

ББМ уменьшался во второй группе животных до 1.9 ± 0.2 мс по сравнению 2.5 ± 0.1 ($p < 0.05$).

Ранее с использованием метода регистрации моторных потенциалов мышц вызванных эпидуральной стимуляцией спинного мозга нами было показано, что гипотермия снимает эффекты травмы на нейрональную возбудимость в раннем периоде травматической болезни спинного мозга, но в то же время задерживает период восстановления этих центров. По результатам данного исследования было выявлено, что восстановление среднего компонента задерживалось после применения локальной гипотермии в спинальных двигательных центрах ББМ. Возможно, что увеличение скорости проведения возбуждения сигнала в нервно-моторном аппарате исследуемых мышц как после травмы, так и при применении в качестве лечения гипотермии свидетельствует об остаточной гиперрефлексии в исследуемых мышцах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-01746.

Сигнальная система, управляющая конусом роста аксона при воздействии электрическим полем

Рамазанова И.Ф., Котов Н.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Направление развития конуса роста аксона (нейритов) определяется сигнальной системой, работа которой до сих пор остаётся непонятной.

В целом считается, что физические и химические факторы во внеклеточной среде играют важную роль в определении направления роста нейритов. Одним из видов физических факторов, определяющих направление конуса роста аксонов, является наличие в ткани слабых внеклеточных электрических полей. Причём исследования показывают, что рост нейритов в экспериментах был направлен к катоду. Мы попытались объяснить результаты экспериментов на основе анализа внутриклеточных процессов.

Когда происходит развитие конуса роста аксонов, прежде всего, формируются филоподии (Ф) – тонкие выросты диаметром приблизительно 0.1–3 мкм и длиной до 50 мкм. Нами был проведён анализ зависимости стационарной концентрации кальция в таких отростках от стационарной концентрации кальция в ламеллоподий при помощи математической модели и были сделаны выводы об автономности Ф относительно ламеллоподий и друг друга. Из свойства автономности следует, что изменение стационарной концентрации кальция при изменении трансмембранной разности потенциалов будет происходить независимо у каждой Ф. Изменение стационарной концентрации кальция у Ф, находящихся со стороны анода, никак не повлияет на изменение стационарной концентрации кальция у Ф со стороны катода. Следовательно, автономность в контексте кальциевой сигнализации позволяет рассматривать каждый микровырост отдельно от конуса роста аксона в целом.

При воздействии внешним электрическим полем на катодной стороне конуса роста аксона образуется область деполяризации цитоплазматической мембраны, на анодной – гиперполяризации. В области гиперполяризации мембраны уменьшается время жизни кальциевых каналов в открытом состоянии и, соответственно, уменьшается величина входящего кальциевого тока на анодной стороне клетки, что будет приводить к уменьшению стационарной концентрации кальция. Уменьшение стационарной концентрации кальция, в свою очередь, приводит к активации кальмодулин-аденилатциклазы и, как следствие, к росту концентрации циклического аденазинмонофосфата (сАМР). сАМР активизирует протеинкиназу А, что приводит к фосфорилированию связывающего центра серина (S157) вазодилатор-стимулированного белка (VASP). Нефосфорилированный белок VASP содействует полимеризации актина. При фосфорилировании же S157 блокируется связывание VASP со спектрином, что в дальнейшем ингибирует полимеризацию актиновых филаментов и их комплексообразование. И как следствие к деградации Ф.

Уменьшение стационарной концентрации кальция также активирует гуанизин-трифосфат Rho, который стимулирует MLC-киназу (MLCK) посредством цитрона-К, увеличивая сокращение актин-миозинового комплекса. В то же время активация Rho приводит к стимуляции протеинкиназы N, которая при помощи α -актинина усиливает деполимеризацию актина, что, в свою очередь, также проявляется в разрушении микровыростов.

На стороне конуса роста, обращённой к катоду, гуанизин-трифосфат Cdc42, наоборот, активируется вследствие повышения стационарной концентрации кальция, что в дальнейшем активирует нейронный белок синдрома Вискотта-Олдрича N-WASP и семисубъединичный белковый комплекс ARP 2/3, вызывая увеличенный рост актиновых филаментов. Другой гуанизин-трифосфат Rac1, также активируемый повышенной стационарной концентрацией кальция, ингибирует Rho, предотвращая коллапс Φ , направленных в сторону катода. Rac1 при помощи стимулирования серин/треониновой-протеинкиназы (PAK-1) активирует LIM-киназу, которая инактивирует актин-разрушающий белок кофилин, тем самым увеличивая полимеризацию актина. В то же время PAK-1 ингибирует MLCK, предотвращая сокращение актин-миозинового комплекса.

При повышенной стационарной концентрации кальция на катодной стороне конуса роста аксона комплекс кальций-кальмодулин активирует фосфодиэстеразы cAMP, которые подавляют её эффект как вторичного посредника. В результате не происходит ингибирования полимеризации актиновых филаментов, что приводит к их росту.

Таким образом, мы предполагаем, что механизм управления конусом роста аксона с помощью электрического поля обусловлен тем, что в Φ и микровыростах, направленных в сторону катода, происходит увеличение стационарной концентрации кальция, которая индуцирует активацию процессов, приводящих к сборке, а со стороны анода при уменьшении концентрации кальция – к разборке цитоскелета. Что, собственно, с нашей точки зрения, и определяет поворот конуса роста аксона в сторону катода.

Исследование уровня холин оксидазы в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга мышей после опорной разгрузки и реадаптации

Россомахин Р.А.¹, Нуруллин Л.Ф.^{1,2}, Тяпкина О.В.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

В последнее время взгляд исследователей обращён в сторону роли окислительного стресса в генезе расстройств, возникающих в организме млекопитающих и человека, находящихся в условиях реального космического полёта и моделирования его эффектов на Земле. Развивая идею о роли мотонейронов спинного мозга, иннервирующих скелетные мышцы конечностей в патогенезе гипогравитационного двигательного синдрома (ГДС), высказанную Козловской Инессой Бенедиктовной и поддержанной в нашей лаборатории Никольским Евгением Евгеньевичем, можно предположить, что окислительный стресс может влиять на сами мотонейроны, и их окружение. Холин оксидаза катализирует окисление холина и альдегида бетаина до бетаина с использованием кислорода и продуцированием перекиси водорода. Этот фермент относится к семейству оксидоредуктаз и может быть задействован как в процессах перекисного окисления, так и в метаболизме глицина, серина и треонина, что так же может явиться некоторым фактором, опосредующим развитие ГДС. В связи с этим целью настоящего исследования явилось иммунофлуоресцентное исследование мотонейронов поясничного отдела спинного мозга мышей, находящихся в условиях антиортостатического вывешивания задних конечностей 30 суток и после 7-суточного периода реадаптации после «вывешивания» с использованием специфичных антител к холин оксидазе. Эксперименты проводили на самцах мышей c57black/6 (вес 28.3 ± 0.6 г), половозрелого возраста (7–9 недель). Криостатные, свободно плавающие поперечные срезы (20 мкм) окрашивали первичными поликлональными антителами к холин оксидазе (1:100, Abcam Plc, 12 часов, $+4^{\circ}\text{C}$). Затем использовали вторичные антитела (IgG козьиные против кролика) конъюгированные с флуорохромом Alexa488 (1:1000, Invitrogen). При одинаковых условиях приготовления препаратов интенсивность иммунофлуоресценции в мотонейронах оценивали по интенсивности свечения. Было выявлено отсутствие изменений интенсивности свечения у мышей после 30 суток «вывешивания», а после 7-суточной реадаптации после 30-суточной опорной разгрузки уровень интенсивности флуоресценции увеличивался на 65% от значений, полученных в контрольной группе животных. Таким образом, период реадаптации животных после опорной разгрузки является критическим моментом, когда в мотонейронах могут возникать существенные изменения.

Уровень активности коры больших полушарий во фронтальной области и зоне вертекса при действии NaCl и C₆H₁₂O₆ в качестве вкусовых раздражителей

Саваневская Е.Н.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Регистрация электрической активности коры больших полушарий при действии адекватных стимулов на вкусовые рецепторы в более ранних исследованиях осуществлялась либо в области фронтальной коры, либо в зоне вертекса. Эти и подобные исследования были сконцентрированы на установлении различий в уровне активности коры больших полушарий при действии различных вкусовых раздражителей. Сравнительному анализу паттернов активации в этих местах регистрации уделялось второстепенное внимание. Кроме того, исследования, посвящённые сенсорному этапу вкусовой рецепции, проводились, главным образом, при помощи метода регистрации вызванных потенциалов. Однако Wallroth et al. (2018) опубликовали доказательства в пользу принципиальной возможности извлечения информации о сенсорном этапе возникновения вкусового ощущения из неусредненного электроэнцефалографического сигнала. Основное внимание при реализации такого подхода уделяется анализу Δ -частотного диапазона спектра ЭЭГ.

Цель – провести сравнительный анализ степени активации коры больших полушарий в отведениях Fp1–A1 и C3–A1 при предъявлении NaCl и C₆H₁₂O₆ в качестве вкусовых раздражителей.

В обследовании участвовали 11 испытуемых обоего пола в возрасте от 17 до 20 лет (8 девушек и 3 юношей). Все испытуемые были правшами. С целью установления динамики электрической активности при действии вкусовых раздражителей производилась регистрация поверхностной электроэнцефалограммы с помощью аппарата «Нейрон-Спектр-4» («Нейрософт»), (Российская Федерация). Запись электроэнцефалограммы осуществлялась стандартными электродами в 8-миканальном отведении (референтные электроды на мочках ушей), наложенными в соответствии с международной схемой 10–20.

Испытуемым в порядке возрастания солёности предъявлялись водные растворы поваренной соли в концентрациях 0.48 г/дм³, 0.69 г/дм³, 0.98 г/дм³, 1.4 г/дм³, 2 г/дм³, 4 г/дм³, 9 г/дм³, а также водные растворы глюкозы в концентрациях 10 г/дм³, 50 г/дм³, 100 г/дм³, 200 г/дм³. Перед началом обследования использовалась питьевая вода в качестве контрольного раствора. Все растворы имели комнатную температуру и предъявлялись для помещения в рот в объёме 10 мл.

Для анализа каждого из этапов обследования использовались 25-секундные отрезки энцефалограммы, прошедшие ручную обработку с целью устранения артефактов. С помощью встроенной компьютерной программы в каждом из нечетных периодов для отведенных сигналов рассчитывали

относительную спектральную мощность в частотном диапазоне Δ (0.5–4 Гц). Для проведения множественных сравнений использовался однофакторный дисперсионный анализ для связанных выборок (one-way repeated-measures ANOVA) или критерия Фридмана (Friedman rank sum test) в случае отклонений данных от нормального распределения. Нормальность распределения проверялась по критерию Шапиро-Уилкса, гомоскедастичность – по критерию Левена, сферичность – с помощью теста Муучли. Апостериорные сравнения проводились с использованием теста Тьюки с поправкой на зависимость наблюдений. Все различия признавались достоверными при $p < 0.05$.

При сравнении экспериментальных и контрольных значений мощности спектров дельта-диапазона в отведениях Fp1–A1 и C3–A1 можно отметить ряд особенностей. В первую очередь, результаты серии с предъявлением соленого раствора достоверно отличались от контроля наблюдались в обоих отведениях. При этом в лобном отведении они были более выражены. В серии с применением раствора глюкозой значимые отличия от контроля зафиксированы только в отведении Fp1–A1. Это может свидетельствовать о том, что рост дельта-активности коры больших полушарий при действии вкусового стимула в вертектальной зоне выражен слабее по сравнению с лобной.

В случае с предъявлением раствора соли, в обоих указанных отведениях самое низкое абсолютное значение дельта мощности обнаружено при концентрации 0.98 г/дм³, а самое высокое – при предъявлении физраствора. При воздействии раствором глюкозы мощность дельта-диапазона в обоих отведениях была самой низкой для концентрации 10 г/дм³. Высокие значения мощности ЭЭГ в этих отведениях наблюдались при разных концентрациях сладкого (50 г/дм³ и 200 г/дм³ соответственно).

Таким образом, полученные результаты не противоречат имеющимся в литературе сообщениям о принципиальной возможности регистрации в ЭЭГ-сигнале компонентов, соответствующих активации нейронных сетей коры больших полушарий при предъявлении специфических раздражителей рецепторному отделу вкусового анализатора.

Активация транскрипции мутантного гена дисферлина в фибробластах кожи человека с использованием технологии CRISPR-Cas9 SAM как тест-система для подбора лекарственных препаратов при дисферлинопатиях

Старостина И.Г.¹, Шаймарданова А.А.¹, Соловьева В.В.¹, Аглиуллина Д.Р.¹, Яковлев И.А.^{1,2,3,4}, Деев Р.В.^{3,4}, Исаев А.А.⁴, Ризванов А.А.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² ООО Genotarget, Москва, Россия

³ Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Рязань, Россия

⁴ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

Дисферлинопатии – группа нейромышечных заболеваний, возникающих вследствие отсутствия/нарушения функциональности белка дисферлина вследствие мутаций в гене *dysf*. Дисферлин играет важную роль в репарации мембран мышечных клеток. Синтез дефектного белка приводит к нарушению процессов репарации в мышечной ткани и её атрофии (Старостина и др., 2013). Несмотря на высокую интенсивность исследований дисферлинопатии остаются группой неизлечимых наследственных заболеваний. Одной из основных причин низкой эффективности методов лечения является отсутствие модели, наиболее точно воспроизводящей патологические процессы данного заболевания (Yakovlev et al., 2016). Широко используются модели на основе животных, однако из-за значительных генетических отличий они не способны в полной мере воспроизвести все особенности протекания болезни у человека. Перспективным способом лечения дисферлинопатий в настоящее время является генная терапия и модельные системы на основе клеточных линий человека, дефектных по дисферлину, представляют интерес для тестирования новых генотерапевтических препаратов.

Известно, что дисферлин в большом количестве экспрессируется в мышечных клетках, однако в связи с определёнными трудностями выделения и культивирования данного типа клеток возникает необходимость поиска альтернативных источников клеточного материала. В качестве клеточной модели для исследования дисферлинопатий в настоящей работе предложены фибробласты кожи человека, в которых с использованием системы CRISPR-Cas9 SAM (Konegmann et al., 2015) активирована экспрессия дисферлина.

В настоящей работе из кожи пациента с дисферлинопатией с мутацией в 26 экзоне гена *dysf* были выделены фибробласты и иммортализованы путём инактивации белка-онкосупрессора p53. Для этого нативные фибробласты были генетически модифицированы рекомбинантным лентивирусом, кодирующим киРНК к нуклеотидной последовательности гена p53. Рекомбинантные лентивирусные частицы получали путём ко-трансфекции клеток НЕК293Т кальций-фосфатным методом с использованием векторной, упаковочной и оболочечной плазмид. Отсутствие экспрессии p53 в

генетически модифицированных фибробластах подтверждали с помощью вестерн-блот анализа и ПЦР в режиме реального времени.

Для транскрипционной активации иммортализованных фибробластов использовали рекомбинантные лентивирусы, кодирующие транскрипционные факторы P65 и VP64, а также гидовую РНК. После лентивирусной трансдукции проводили селекцию генетически модифицированных иммортализованных фибробластов с использованием антибиотиков зеоцина, гигромицина и бластицидина. Полученная таким образом культура фибробластов с экспрессией мутантной формы дисферлина может быть использована для дальнейших исследований молекулярных механизмов патогенеза дисферлинопатий, разработки новых технологий терапии нейромышечных заболеваний и подбора лекарственных препаратов при дисферлинопатиях.

Литература

1. Старостина И.Г., Соловьева В.В., Юрьева К.С., Шевченко К.Г., Федотов В.П., Ризванов А.А., Деев Р.В., Исаев А.А.: Дисферлинопатии: возможности диагностики, моделирования и генно-клеточной терапии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т.8, №3, С.61–70.
2. Yakovlev I.A., Deev R.V., Rizvanov A.A., Solovyova V.V., Starostina I.G., Isaev A.A.: Mutation correction in exons 3 and 26 of DYSF gene by artificial trans-splicing // Human gene therapy. 2016. V.27, N.11, P. A137–A138.
3. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F.: Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex // Nature. 2015. V.7536, N.517, P. 583–588.

Влияние опорной стимуляции на анаболические процессы в камбаловидной мышце крысы на фоне 7-суточного вывешивания

Тыганов С.А., Мочалова Е.П., Белова С.П., Рожков С.В.,
Калашников В.Е., Шенкман Б.С.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Гравитационная разгрузка приводит к устранению воздействия веса тела на скелетную мускулатуру, а также к устранению опорной афферентации – сигнала, который поступает от кожных механосенсоров стопы (Kozlovskaya et al., 2007). На разных моделях было показано, что добавление искусственного опорного стимула на фоне гравитационной разгрузки способно предотвратить развитие атрофических изменений постуральной мышцы (Григорьев и др., 2004; Шенкман и др., 2004, Curaras et al., 2005). В данной работе мы проанализировали влияние опорной стимуляции на анаболические процессы и развитие атрофии в результате 7-суточного антиортостатического вывешивания крыс линии Wistar. На фоне вывешивания у части животных была проведена механическая стимуляция опорных зон стопы с помощью подвижной платформы, которая прикреплялась к лапе крысы и симулировала ходьбу животного. Стимуляция проводилась по 4 часа каждый день гравитационной разгрузки. Давление на стопу составляло 13.9 мН (Curaras et al., 2005). По окончании вывешивания проводился анализ влияния разгрузки на ключевые маркеры анаболических сигнальных путей с помощью вестерн-блоттинга. Максимальная сила и жесткость изолированной *m. soleus* оценивались с помощью Aurora Scientific lever arm system 305C-LR.

Гравитационная разгрузка в течение 7 суток привела к достоверному ($p < 0,05$) снижению массы *m. soleus* на 25%. При этом, опорная стимуляция никак не влияла на массу *m. soleus*. После 7 суток антиортостатического вывешивания также наблюдалось снижение максимальной изометрической силы и жесткости *m. soleus* на 37% и 31% соответственно. Однако опорная стимуляция позволила сохранить максимальную силу изолированной *m. soleus* на контрольном уровне, а для пассивной жесткости наблюдался достоверный рост на 40% от контроля. Одним из ключевых сигнальных путей, регулирующих синтез белка на уровне инициации трансляции, является сигнальный путь IGF-1/АКТ/mTORC1, эффекторами которого являются рибосомальная киназа p70 (p70S6k) и белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E (4E-BP1). После 7 суток вывешивания наблюдалось достоверное снижение фосфорилирование как p70S6k, так и 4E-BP1 на 26% и 23% соответственно. Опорная стимуляция позволила предотвратить это снижение. Регуляция инициации трансляции может так же происходить через киназу гликогенсинтазы GSK-3 β , для которой наблюдалось достоверное снижение фосфорилирования на 33% на 7 сутки

вывешивания. Опорная стимуляция также возвращала фосфорилирование GSK-3 β на контрольный уровень.

Таким образом, опорная стимуляция позволяет предотвратить изменение механических параметров постуральной мышцы в результате гравитационной разгрузки, а также восстановить фосфорилирование маркеров синтеза белка до контрольного уровня. Однако воздействие искусственным опорным стимулом на стопу крысы не является достаточным для полного преодоления развития атрофии *m. soleus*.

Работа поддержана грантом РФФИ ОФИ-М № 17-29-01029.

Иммунофлуоресцентное исследование ATG8 в *m. soleus* мышей после опорной разгрузки и реадаптации

Тяпкина О.В., Нуруллин Л.Ф., Дмитриева С.А.

Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

ATG8 представляет собой убиквитиноподобный белок, необходимый для аутофагии (внутриклеточного распада белка), который модифицируется последовательным воздействием ATG4, ATG7 и ATG3, после конъюгации с фосфатидилэтаноламином становится способным образовывать аутофагосомы. Целью настоящего исследования явилось исследование уровня иммунофлуоресценции белка ATG8 в *m. soleus* у мышей, находящихся в условиях опорной разгрузки (моделирование гипогравитации) и после 7-суточного периода восстановления и адаптации к нормальным условиям активности мышц. Эксперименты проводили на самцах мышей c57black/6 (вес 28.3 ± 0.6 г), половозрелого возраста. Мышцы окрашивали первичными поликлональными антителами к ATG (1:100, Abcam., 12 часов, $+4^{\circ}\text{C}$). Затем использовали вторичные антитела (IgG козлиные против кролика) конъюгированные с флуорохромом Alexa488 (1:1000, Invitrogen). При одинаковых условиях приготовления препаратов интенсивность иммунофлуоресценции в мышце оценивали по интенсивности свечения. Было выявлено увеличение интенсивности флуоресценции на 67% у мышей после 30 суток «вывешивания». К 7 суткам реадаптации после 30-суточной опорной разгрузки уровень интенсивности флуоресценции не отличался от значений, полученных у мышей после 30-суточной опорной разгрузки и составил 46% от контроля. Таким образом, увеличение уровня экспрессии ATG8 в *m. soleus* мышей после опорной разгрузки и после периода реадаптации даёт основание заключить, что снижение двигательной активности мышц может приводить к активации процессов аутофагии.

Острые судорожные приступы после латерального гидродинамического удара, наносимого крысам в свободном поведении

Франкевич С.О., Комольцев И.Г.

Научный руководитель: Гуляева Н.В.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Введение. На сегодняшний день прогнозирование развития посттравматической эпилепсии затруднено по причине длительного периода бессимптомного эпилептогенеза и появления эпилептических приступов через годы после ЧМТ у человека или месяцы у крыс. Острые судорожные приступы являются значимым фактором риска ПТЭ в клинике. Для изучения механизма эпилептогенеза используют модели на животных, но большинством авторов ЧМТ наносится крысам под действием наркоза, что затрудняет анализ острых приступов и их последствий, а также не соответствует условиям ЧМТ у человека. Нами была предпринята попытка оценить поведенческие и физиологические последствия ЧМТ у крыс в свободном поведении. Закономерность семиологии острого судорожного приступа, нарушения сознания, дыхания, гемодинамики и рефлексов в первые минуты после ЧМТ у крыс является важной характеристикой модели. Особенности острых судорог могут коррелировать с повреждением в коре и гиппокампе, а также играть роль в развитии отдалённых последствий ЧМТ, однако, подходы к оценке острых посттравматических приступов до сих пор не разработаны.

Цель исследования. Провести анализ острых последствий ЧМТ у крыс: выявить особенности семиологии острых судорожных приступов, нарушений дыхания, гемодинамики, восстановления чувствительности и рефлексов в первые 5 минут после латерального гидродинамического удара у крыс, наносимого в свободном поведении.

Материалы и методы. Исследование проводили на 60 крысах самцах линии Wistar средней массой 500 г в возрасте около 6 месяцев. Скальпирование крыс и наложение трепанационного отверстия проводили под изофлурановым наркозом. ЧМТ моделировали нанесением гидродинамического удара силой около 3 атм в область правой сенсомоторной коры после полного выхода из наркоза. Проводили видеозапись травмы и 5 минут острого посттравматического периода. По видеозаписям анализировали семиологию судорожного приступа (прыжок, побегу, шагательные движения, тоническую и клоническую фазы приступа, судороги хвоста и движения вибрисс) и длительность каждого проявления, оценивали дыхание животного (апноэ, судорожное или поверхностное дыхание), наличие цианоза конечностей и время восстановления реакции на боль и вестибуло-спинального рефлекса.

Результаты. Судорожные проявления ЧМТ той или иной степени выраженности наблюдались у 100% животных. Летальность составила 15%.

У 63% крыс первой реакцией на ЧМТ был прыжок. Последовательность судорожных проявлений широко варьировала от животного к животному. Длительность тонико-клонической фазы составила 19 ± 4 с (тонус 9 ± 2 с, клонус 7 ± 2 с), длительность судороги хвоста – ещё 10 ± 2 с. Длительность апноэ составила в среднем 35 ± 6 с. Восстановление вестибуло-спинального рефлекса при повороте крысы направо наблюдали достоверно раньше, чем при повороте налево ($p < 0.01$). Проведён подробный корреляционный анализ проявлений судорог, показавший наличие зависимости восстановления чувствительности хвоста, пассивного вестибуло-спинального рефлекса и восстановления позы от длительности прыжков и длительности тонической фазы острого судорожного приступа. У крыс с летальным исходом достоверно дольше наблюдали судорожное (глубокое) дыхание ($p < 0.01$) и меньше – поверхностное ($p < 0.05$). У крыс с нарушением гемодинамики (цианоз конечностей) достоверно дольше наблюдали судорожное дыхание, а также дольше восстанавливались: поза, болевая чувствительность и активные движения ($p < 0.05$).

Выводы. Впервые проанализированы острые проявления ЧМТ при нанесении латерального гидродинамического удара крысам в свободном поведении, что позволяет проводить детальный анализ острых судорожных приступов и других нарушений, исключив при этом действие наркоза. Найденные изменения могут коррелировать со степенью морфологических и поведенческих отклонений, а также являться предиктором развития поздних осложнений, что требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Поддержано грантом РФФИ № 18-315-00146.

NFAT-зависимые механизмы регуляции фенотипа волокон камбаловидной мышцы крыс при гравитационной разгрузке

Шарло К.А.¹, Львова И.Д.¹, Каламкаров Г.Р.², Шенкман Б.С.¹

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Скелетные мышцы образованы волокнами разного типа, различающимися по функциональным характеристикам. «Медленные» волокна отличаются высокой степенью устойчивости к утомлению, но пониженной максимальной силой и скоростью сокращения. «Быстрые» волокна обладают высокой скоростью и силой сокращения, а также высокой утомляемостью. Тип мышечного волокна определяется преобладанием той или иной изоформы ияжёлых цепей миозина (ТЦМ), т.е. миозиновым фенотипом. При гравитационной разгрузке в космическом полёте и моделируемой гравитационной разгрузке в экспериментальных условиях на Земле часть медленных волокон превращается в быстрые за счёт изменений экспрессии генов ияжёлых цепей миозина в камбаловидной мышце *m. soleus*, у человека отвечающей за поддержание вертикального положения тела. Известно, что при функциональной разгрузке задних конечностей у крыс в камбаловидных мышцах происходит снижение уровня оксида азота, что в свою очередь приводит к активации GSK-3 β , экспорту NFATc1 из мышечных ядер и снижению экспрессии ТЦМ I(β) (Lomonosova, 2011; Sharlo, 2018).

Целью данной работы было выявление NO-зависимых механизмов, вносящих вклад в снижение экспрессии ТЦМ I(β) в камбаловидной мышце крыс после первой недели вывешивания и выявление роли транскрипционного фактора NFAT в функционировании данных механизмов. Самцы крыс породы Вистар были разделены на пять экспериментальных групп: виварный контроль (С), и четыре группы, вывешенные в течение 7 дней: группа чистого вывешивания 7HS, группа с введением L-аргинина 7HS+A, группа с совместным введением L-аргинина и ингибитора NO-синтазы 7HS+AN, а также группа с введением ингибитора GSK-3 β 7HS+G. После 7-суточного вывешивания в ядерной фракции камбаловидных мышц было обнаружено достоверное уменьшение содержания транскрипционного фактора NFATc1 и достоверное снижение экспрессии ТЦМ I(β), при этом как введение L-аргинина, так и ингибирование GSK-3 β у вывешенных животных возвращало содержание NFATc1 в ядерной фракции и уровень экспрессии ТЦМ I(β) на уровень контроля. Введение L-аргинина и ингибирование GSK-3 β также предотвращало вызванную вывешиванием инактивацию сигнального пути M μ h7b/mir-499, являющегося путём положительной обратной связи поддержания экспрессии ТЦМ I(β), а также предотвращало снижение экспрессии PGC-1 α : мы предполагаем, что влияние на экспрессию PGC-1 α в нашем эксперименте могло быть оказано за счёт действия mir-499, так как данная микро-РНК способна активировать экспрессию PGC-1 α в скелетных мышцах (Xu et al., 2018). Экспрессия эндогенного ингибитора сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 кальсарцина-2 была

достоверно повышена во всех вывешенных группах, исключая группу 7HS+A, экспрессия кальсарцина-2 в которой не отличалась от контроля. Введение ингибитора NO-синтазы блокировало все выявленные эффекты L-аргинина, что позволяет сделать вывод о том, что все наблюдавшиеся эффекты L-аргинина были обусловлены его NO-донорными свойствами.

Таким образом, мы выявили ряд NO-зависимых сигнальных механизмов, приводящих к поддержанию уровня NFATc1 в мышечных ядрах и уровня экспрессии ТЦМ I(β), при этом функционирование некоторых из этих механизмов осуществляется за счёт ингибирования оксидом азота активности GSK-3 β .

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-15-00107.

Влияние инерции дневного сна на компоненты вызванных потенциалов при распознавании трудноразличимых звуков

Шилов М.О., Левкович К.М., Мартынова О.В., Украинцева Ю.В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Инерция сна – состояние перехода от сна к бодрствованию, которое характеризуется сниженным вниманием и производительностью. Инерция является нормальным явлением и может длиться от нескольких минут до нескольких часов. По причине инерции сна могут возникать потенциально опасные ситуации. Например, в военной или медицинской области, сотрудники которых часто внезапно просыпаются ночью и должны сразу решать сложные задачи. Причём трудности могут возникать ещё на уровне различения звуковых сигналов. При этом до сих пор не был раскрыт вопрос, на каком этапе нарушается анализ сигналов – на позднем, связанном с направленным вниманием и принятием решения, или он нарушается уже на раннем этапе, анализа сенсорных характеристик стимула. Поэтому в нашем исследовании мы поставили цель изучить влияние инерции дневного сна на компоненты вызванных потенциалов, как ранние (N1, P2, N2, MMN) так и поздние (P3a и P3b) при распознавании трудноразличимых звуков.

Эксперимент предполагал распознавание трудноразличимых звуков до и после дневного сна длительностью около 1 часа. В исследовании приняли участие 35 здоровых добровольцев (правши, возраст от 19 до 25 лет). В начале эксперимента следовала сессия распознавания длительностью 10 мин, в течение которой испытуемые с закрытыми глазами прослушивали предъявляемые в случайном порядке звуки: стандартный звук (повторялся часто), и два девиантных звука (повторялись редко), один из которых был на 5 Гц выше, а другой – на 5 Гц ниже стандартного. В ответ на стимулы регистрировались вызванные потенциалы (ВП). Испытуемые должны были нажимать на кнопку, когда они слышат один из девиантов и игнорировать стандартный звук и второй девиант. Далее следовал дневной сон, через 1 час испытуемых будили. После пробуждения испытуемые заполняли опросник субъективной оценки качества сна, сразу после чего повторялась сессия распознавания. Оценивали количество правильных ответов до и после сна, а также амплитуду и латентность компонентов ВП в ответ на значимые стимулы. По полисомнограмме анализировали архитектуру дневного сна. С помощью ANOVA для повторных измерений оценивали влияние глубины сна на поведенческие показатели распознавания – сравнивали тех испытуемых, у кого регистрировалась 3-я стадия, и тех, у кого была только 2-я. Помимо этого, анализировали влияние сна на распознавание у испытуемых, разбуженных во время поверхностного сна (2-я стадия), и у испытуемых, разбуженных во время глубокого сна (3-я стадия). Основываясь на поведенческих данных, с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни анализировали различие в латентном периоде и амплитуде вызванных потенциалов среди групп с разной глубиной сна.

Выявлено различное влияние дневного сна на точность распознавания звуков в зависимости от его глубины: если у испытуемых, спавших неглубоким сном в сессии после сна отмечается некоторое повышение точности, то у субъектов с глубоким сном апостериорный анализ выявил её достоверное снижение. Также выявлен различный эффект на распознавание пробуждения из глубокого и поверхностного сна: испытуемые, разбуженные во время 2-й стадии после сна распознавали несколько лучше, тогда как разбуженные во время 3-й стадии – достоверно хуже. Анализ амплитуды и латентности ВП показал, что сильнее всего инерция сна проявлялась в увеличении латентности P2 в отведении Pz, а также уменьшении амплитуды данного потенциала в отведении Fz у группы с инерцией сна. Более того, у испытуемых, с глубоким сном (с 3-й стадией) латентность P3b в отведении Cz и Pz была больше, чем у людей с поверхностным сном.

Можно заключить, что дневной сон, если его глубина достигает 3-й стадии, имеет инерцию, которая оказывает негативное влияние на распознавание трудноразличимых звуков. Особенно велико влияние инерции на деятельность, если человек был разбужен во время глубокой стадии дневного сна. Негативное влияние инерции сна на деятельность ассоциировано с увеличением латентности и уменьшением амплитуды P2, то есть можно предположить, что ухудшение распознавания происходит ещё на неосознанном, сенсорном, уровне восприятия. С другой стороны, глубокий сон способствует увеличению латентного периода P3b, что может свидетельствовать о снижении направленного внимания при выполнении задания.

Исследование поддержано РФФИ (проект № 18-013-01187 А).

Степень повреждения функциональных зон неокортекса крыс коррелирует с поведенческими отклонениями в остром периоде черепно-мозговой травмы

Широбокова Н.И., Комольцев И.Г.

Научный руководитель: Гуляева Н.В.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Последствия ЧМТ у человека включают в себя развитие неврологического дефицита, тревожных и депрессивных расстройств. Для понимания механизмов этих последствий используют модель латерального гидродинамического удара у крыс, однако, сопоставление нарушений поведения и морфологических изменений в неокортексе у крыс в раннем периоде ЧМТ проведено на настоящий момент не в полной мере. Детальный анализ анатомических и функциональных областей головного мозга крысы возможен при использовании «плоских карт» (Ndode-Ekane, 2016), которые, к сожалению, не учитывают постепенного формирования зоны глиоза и некроза в коре в остром периоде ЧМТ.

Задачей исследования была качественная и количественная оценка степени повреждения в неокортексе с учётом вовлечения функциональных областей коры и сопоставление полученных результатов с поведенческими нарушениями в остром периоде ЧМТ у крыс.

Работа выполнена на 48 белых крыс линии Wistar средней массой 500 г в возрасте 6 месяцев. ЧМТ ($n = 20$) моделировали при помощи нанесения латерального гидродинамического удара силой около 3 атм в область правой сенсомоторной коры. Ложная операция (ЛО, $n = 20$) проведена без нанесения ЧМТ. Использовали группу чистого контроля (ЧК, $n = 8$). Первую серию крыс выводили из эксперимента на 3 сутки после ЧМТ (ЛО, $n = 11$; ЧМТ $n = 8$). У второй серии крыс оценивали поведение в тесте темная-светлая камера и в тесте открытое поле на 5 день, в тесте крестообразный приподнятый лабиринт - на 6 день после ЧМТ ($n = 12$), ложной операции ($n = 9$) и у группы чистого контроля ($n = 8$) и выводили из эксперимента на 7 сутки после ЧМТ методом прижизненной внутрисердечной перфузии 4% раствором формальдегида в фосфатном буфере (рН 7.4). Анализировали срезы мозга толщиной 50 мкм от 1 до 7 мм каудальнее брегмы с расстоянием 600 мкм между ними, окрашенные по методу Ниссля. Микрофотографии делали на микроскопе Keyence BZ-X700. Расчёты площади повреждения проводили с помощью программы ImageJ. По полученным микрофотографиям (8–9 срезов мозга каждой крысы) определяли координаты границ области повреждения в коре и с помощью «плоских карт» головного мозга крысы выявляли анатомические области повреждения, а также рассчитывали площадь повреждения на «плоской карте». Степени повреждения коры на каждом срезе определяли по баллам: 1 балл – глиоз 6-го слоя коры и прилежащего белого вещества; 2 балла – некроз 6 слоя коры и прилежащего белого вещества и глиоз

3-6 слёв коры; 3 балла – некроз 3-6 слоя коры и глиоз 1-6 слоёв коры; 4 балла – некроз всех слоёв коры.

Средняя площадь очага повреждения в коре на «плоской карте» составляла 63.7 мм². Функциональные области повреждения включали в себя: S1 – первичную соматосенсорную кору, в том числе: S1BF, представительство вибрисс (barrel field) и S1Tr, представительство туловища; LPtA, латеральная теменная ассоциативная кора; PtPD и PtPR, теменная кора задне-дорсальные и задне-ростральные отделы, AuD вторичная слуховая кора, дорсальные отделы, V2L вторичная зрительная кора, латеральные отделы.

Анализ поведения выявил незначительные изменения в поведении крыс группы ЧМТ при сравнении с поведением крыс группы ЛО: уменьшение числа стоек, уменьшение числа умываний в тесте открытое поле, уменьшение числа стоек в тесте темно-светлая камера. Обработка теста открытое поле в программе Noldus дополнительно выявило увеличение латентности достижения периферической части открытого поля (концентрическое поле 0–10 см от стенки поля), а также уменьшение длительности обнюхивания и числа обнюхивания промежуточной части открытого поля (концентрическое поле 10–20 см от стенки поля). Длительность обнюхивания и число обнюхиваний промежуточной части открытого поля коррелировали со степенью повреждения неокортекса ($p < 0.05$), т.е. вышеописанные изменения больше проявлялись у крыс с массивным некрозом коры), но не с площадью повреждения.

Выводы. Детальный анализ повреждения при помощи «плоских карт» функциональных зон неокортекса является удобным и информативным способом оценки повреждения в коре. Обнаруженные изменения поведения крыс в открытом поле в остром периоде ЧМТ могут быть связаны с сенсорными нарушениями, что подтверждается вовлечением соответствующих функциональных зон неокортекса. Данный подход будет использован для сопоставления повреждения в неокортексе и в гиппокампе в раннем периоде ЧМТ у крыс.

Поддержано грантом РФФИ № 18-315-00146.

Исследование влияния низкочастотной электромиостимуляции, проводимой в ходе «сухой» иммерсии, на характеристики вертикальной стойки

Шишкин Н.В., Амирова Л.Е., Резванова С.Ю., Томиловская Е.С.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Параметры вертикальной стойки претерпевают изменения даже после кратковременного воздействия микрогравитации в космическом полёте (КП) (Kozlovskaya, 1981). Одной из лучших методик, воспроизводящих эффекты КП, является модель «сухой» иммерсии (СИ), по условиям которой испытуемый находится в толще воды, непосредственно с ней не контактируя (Шульженко, Виль-Вильямс, 1975). Она воспроизводит эффекты гипогравитационного двигательного синдрома, сопровождающиеся снижением мышечного тонуса и координационными нарушениями (Григорьев и др., 2004; Kozlovskaya et al., 2007; Shenkman et al., 1997).

Результаты исследований, проведённых в космических полётах, продемонстрировали способность электромиостимуляции (ЭМС) противодействовать развитию негативных изменений в скелетных мышцах.

В данном исследовании мы изучали влияния ЭМС, проводимой в ходе 5-суточной СИ, на характеристики вертикальной стойки.

В исследовании приняло участие 10 здоровых добровольцев. Средний возраст – 30.9 ± 6.4 года, средний вес – 76.4 ± 5.4 кг, средний рост – 174.7 ± 4.4 см.

В ходе иммерсионного воздействия проводили ЭМС мышц ног с использованием низкочастотного электромиостимулятора «Стимул 01-НЧ». Частота стимуляции составляла 25 ± 1 Гц; стимуляцию (1 с стимул, 2 с отдых) проводили ежедневно по 4 часа. Испытуемые произвольно выбирали амплитуду стимуляции так, чтобы обеспечить максимальное сокращение мышц, не сопровождающееся болевыми ощущениями.

Для регистрации постуральных характеристик использовали стабилметрическую платформу Стабилан-02 фирмы «ОКБ Ритм». Анализировали скорость перемещения центра давления (ЦД) и средний разброс колебаний ЦД во фронтальной и сагиттальной плоскостях.

Для анализа мышечной силы использовали аппарат BiodexSystem 3 Pro, оценивающий величину максимального произвольного усилия (МПС). Оценивали МПС мышц-разгибателей голени на угловой скорости $30^\circ/\text{с}$.

Для анализа поперечной жёсткости мышц использовали аппарат MuotonPRO. Прибор регистрировал колебания, возникающие в ответ на механические стимулы стабильной силы (0,4 Н) и длительности (15 мс), прилагавшиеся к исследуемой мышце.

Испытуемые находились в 2-х экспериментальных условиях:

1. Стойка на твёрдой опоре с закрытыми глазами;
2. Стойка на мягкой опоре с закрытыми глазами (на поверхность платформы помещалась поролоновая подушка толщиной 20 см).

Испытатель последовательно находился в каждом из условий по 40 секунд. Исследование проводили 2 раза: до погружения в иммерсию (фон) и в день завершения СИ.

В качестве контрольной группы использовали данные предыдущих экспериментов в условиях 5-суточной СИ без каких-либо воздействий (6 человек). Анализ отобранных испытуемыми величин ЭМС показал, что группа неоднородна и разделяется на 3 подгруппы: (1-я – с интенсивностью не ниже 20 мА и 17 мА для мышц бедра и голени, соответственно, 2-я – от 17 до 20 мА и от 15 до 17 мА, 3-я – не выше 17 мА и 15 мА).

Выявлена значимая положительная корреляция между амплитудой стимуляции и изменениями стабиллографических параметров после завершения эксперимента ($p = 0.0028$ для мышц бедра и $p = 0.0418$ для мышц голени). При этом зависимости между степенью потерь МПС и амплитудой ЭМС найдено не было.

В СИ с ЭМС, в отличие от контрольной группы, было найдено статистически значимое ($p = 0.029$) увеличение скорости колебаний ЦД, что говорит о «расшатывании» стойки. В то же время МПС мышц-разгибателей голени снизилась на 17.3% у испытуемых 1-й группы, на 10% – у 2-й и на 12.5% – у 3-й. В контрольной группе это снижение составило 20%. Поперечная жёсткость икроножной мышцы, измеренная на 3-и сутки СИ, снизилась на 20% по сравнению с фоновыми измерениями. В контрольной группе это снижение составило 9%.

Контрольная группа значимо отличалась от группы с высокой амплитудой стимуляции по изменению скорости перемещения ЦД после иммерсионного воздействия ($p = 0.034$, 1-я, 2-я группы) и по изменению разброса колебаний ЦД ($p = 0.039$, только 1-я группа). Это, вероятно, говорит о том, что ЭМС, уменьшая потери мышечной силы, одновременно не предотвращает изменений в системе управления движением. ЭМС представляется полезным дополнением к батарее профилактических мероприятий, среди которых присутствуют упражнения, направленные на тренировку координации движений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (RFMEFI61317X0074).

АВТОРСКИЙ ИНДЕКС

Абрамочкин Д.В.	2
Абушик П.А.	60
Аглиуллина Д.Р.	133
Альбова П.Е.	103
Амирова Л.Е.	146
Андрианов В.В.	14, 17, 41
Антонов С.М.	60
Арнст Н.И.	118
Архипов А.Ю.	19
Ахметзянова Э.Р.	105
Ахметова М.Ж.	107
Балезина О.П.	27, 35, 39
Балтина Т.В.	126
Белова С.П.	109, 119, 135
Бережнов А.В.	85
Березин С.Р.	103
Богатова К.С.	49
Богачева П.О.	35
Богодвид Т.Х.	14, 17
Большаков А.П.	111
Борисова А.В.	51
Брежестовский П.Д.	31
Бурханова Г.Ф.	54, 68, 89
Бутузов А.В.	111
Бухараева Э.А.	44
Вазетдинова А.А.	73
Валеева Г.	53
Валеева Е.В.	75
Варфоломеев С.Д.	26
Ведунова М.В.	97
Вильчинская Н.А.	123
Винокурова Д.1	54, 68
Волкова А.А.	113
Волобуева М.Н.	111
Вульфийус Е.А.	24
Гайдуков А.Е.	27, 39
Гайнутдинов Х.Л.	3, 14, 17, 41
Гайчик О.В.	122
Гатаулина Э.Д.	64, 66
Герасимова Е.В.	89
Гладков А.В.	81
Григоренко Б.Л.	26

Григорьев П.Н.	16
Гуляева Н.В.	111, 113, 138, 144
Гусев О.А.	121
Деев Р.В.	133
Дерябина И.Б.	14, 17
Дмитриева С.А.	137
Жигалов А.	118
Жиляков Н.В.	19
Журавлева М.Н.	105
Закирьянова Г.Ф.	21
Захаров А.	54
Захаров А.В.	29
Зенько М.Ю.	56
Зефиоров А.Л.	16, 29
Зиганшина А.Р.	58
Иванова М.А.	60
Исаев А.А.	133
Кабдеш И.М.	115
Каламкаров Г.Р.	140
Калашников В.Е.	135
Калигин М.С.	103
Карпова Н.	118
Квичанский А.А.	111
Китаева К.В.	62
Киясов А.П.	118
Клетухина С.Р.	62
Ковязина И.В.	23
Комольцев И.Г.	111, 113, 138, 144
Котов Н.В.	128
Кочнева А.А.	118
Кривой И.И.	5
Крюкова Е.В.	24
Кулесская Н.	118
Кульмаметьева А.Р.	100
Курмашова Е.Д.	64, 66
Лебедева Ю.	54, 68
Лебедев Д.С.	24
Левкович К.М.	116, 142
Ленк-Сантини П.-П.	53
Липачев Н.С.	118
Лобан Е.Ю.	126
Лотфуллина Н.	54, 68
Лущекина С.В.	26
Львова И.Д.	140
Мавликеев М.О.	118
Макаров Р.	53
Маломуж А.И.	7, 37

Мартынова О.В.	116, 142
Массон П.	26
Махаева Г.Ф.	26
Мельникова А.А.	118
Миндубаева Ф.А.	107
Минлебаев М.Г.	51, 77, 100
Мирзоев Т.М.	123
Митева А.С.	27
Михайлова Н.В.	31
Мищенко Т.А.	97
Моисеева Ю.В.	113
Молчанова А.И.	27
Мочалова Е.П.	109, 119, 135
Муранова Л.Н.	14, 17
Мустафин Р.И.	124
Мухамедзянов Р.Д.	29
Мухамедшина Я.О.	105, 115
Мухамедьяров М.А.	43
Мухина И.В.	81, 97
Мухтарова Р.А.	49
Насретдинов А.	53, 68
Немировская Т.Л.	119
Немухин А.В.	26
Нигматуллина Р.Р.	107
Нигметзянов И.Р.	121
Никитина А.В.	69, 71
Никитин Д.О.	69, 71
Николаева Е.А.	122
Нуруллин Л.Ф.	43, 121, 122, 130, 137
Онуфриев М.В.	113
Павельев М.Н.	118
Парамонова И.И.	123
Петров А.М.	21
Петров К.А.	26, 33
Петухова Е.О.	31
Повышева Т.В.	115
Пономарева Д.Н.	31
Порфирьева Н.Н.	124
Проскурина С.Е.	33
Проэнса Гарсия А.	35
Прудников Т.С.	62
Раимова М.В.	126
Рамазанова И.Ф.	128
Раувала Х.	118
Рахматуллина Ф.Ф.	73
Резванова С.Ю.	146
Ризванов А.А.	62, 79, 91, 93, 133

Рожков С.В.	135
Розов А.В.	73
Россомахин Р.А.	130
Рычкова В.	53
Сабиров И.С.	75
Саваневская Е.Н.	131
Самигуллин Д.В.	19
Сафиуллина Л.Р.	75
Семина И.И.	69, 71, 75
Сибгатуллина Г.В.	37
Силантьева Д.И.	14, 41, 126
Ситдикова Г.Ф.	10, 44, 64, 89
Соловьева В.В.	62, 79, 91, 93, 133
Старостина И.Г.	133
Сучков Д.С.	51, 77, 95, 100
Тазетдинова Л.Г.	79
Тарасова Е.О.	39
Ткаченко Н.М.	81
Токальчик Ю.П.	83
Томиловская Е.С.	146
Третьякова Л.В.	111
Тыганов С.А.	109, 135
Тяпкина О.В.	121, 122, 130, 137
Украинцева Ю.В.	116, 142
Фазлеева И.И.	79
Федотова Е.И.	85
Филин И.Ю.	79
Франкевич С.О.	138
Фролова А.В.	41
Хабибрахманов А.Н.	43
Хазипов Р.	53, 54, 68
Хисамиева Г.А.	16
Хожай Л.И.	87
Холмс Г.Л.З	53
Хузахметова В.Ф.	23, 44
Хуторянский В.В.	124
Ценцевицкий А.Н.	23
Цетлин В.И.	24
Чельшев Ю.А.	115
Чернова К.А.	54, 68, 89
Чулпанова Д.С.	62, 79, 91, 93
Шаймарданова А.А.	93, 133
Шарипзянова Л.С.	51, 95
Шарло К.А.	140
Шенкман Б.С.	109, 123, 135, 140
Шилов М.О.	116, 142
Шиловская Е.В.	71

Широбокова Н.И.	144
Широкова О.М	97
Шишкин Н.В.	146
Шумкова В.В.	51
Я аалиноя Х.	118
Яковлев А.В.	64, 66
Яковлева О.В.	44, 46, 103
Яковлев И.А.	133
Ямолдин А.А.	100
Яначкова С.	53
Ярмиев И.З.	46
Яхин К.К.	75
Arkhipova S.S.	99
Juzekaeva E.R.	99
Khazipov R.N.	99
Lushchekina S.	9
Masson P.	9
Minlebaev M.	95
Mukhtarov M.R.	99
Sofronova S.A.	99
Weiss N.	12



Nikon Instruments – мировой лидер в разработке и производстве оптических и цифровых технологий для биомедицинских приложений. Мы поставляем оптические системы «под ключ» – отточенные до мелочей, мощные и производительные. Наши главные продукты – микроскопы и стереомикроскопы, камеры и программное обеспечение. Сервис и поддержка от производителя на территории России

Nikon

Ti2 – микроскопы для прижизненных исследований любой сложности

- **Эпифлуоресценция**

ПО NIS Elements, управляемые компоненты микроскопа Никон, внешние диодные осветители, камеры Никон и топовые камеры других брендов дают возможность сверхбыстрой совместной работы для высокоскоростной автоматизированной съемки, когда требуется быстро и воспроизводимо переключаться между разными позициями, разными каналами флуоресценции и даже методами наблюдения

- **Микроскопия с лазерным возбуждением**

На базе одного микроскопа Ti2-E могут комбинироваться конфокальные системы с системами суперразрешения N-SIM S и N-STORM в различных сочетаниях – теперь с возможностью автоматической смены метода визуализации в процессе автоматизированной съемки

- **Поле зрения 25 мм на боковых портах**

Высококласные объективы с коррекцией аберраций на поле 25 мм и улучшенная оптика микроскопа дают возможность получать изображения в великолепном качестве. Микроскопия в проходящем свете, широкопольная флуоресценция, а теперь и конфокальные системы – в новом, расширенном формате

- **Уникальная гибкость в конфигурации**

Ti2-LAPP: создайте инструмент для собственных задач. Используйте до 5 осветителей (например, для TIRF, фотоактивации и широкопольной эпифлуоресценции), вводите их в оптический путь поочередно или строго одновременно, дихроиками и/или моторизованными зеркалами



www.microscope.healthcare.nikon.com



С характеристиками и примерами использования нашей продукции вы можете более полно ознакомиться на нашем сайте или задав вопрос специалистам:
+7 495 663 77 64 microscopy@nikon.ru



Группа компаний «Химмед» успешно работает на рынке уже более 27 лет. Поставляемый нами товар всегда высочайшего качества. Гарантия тому – отлаженные контакты с непосредственными производителями, скорость и качество поставки товара, высокий профессионализм нашей команды.

Мы являемся официальным дистрибутором ведущих компаний, таких как Merck-Millipore-Sigma-Aldrich, Acros Organics, Scharlau Chemicals, TCI, LGC, Molekula, Alfa Aesar, Eurisotop, Calbiochem, IKA, Labscan, Roth, Supelco, ОАО Химлаборприбор и др.

Компания «Химмед» является дилером мировых лидеров в области производства тонкой химии и современного наукоёмкого лабораторного оборудования: Carl Roth, IDL, AND, , Rigol, IKA, Eppendorf, Memmert, Marienfeld, Simax, Calliper, Dupont, Aldrich, BioWest, Brewer Science, Dionex, Fluka, Fisher Scientific, Santa Cruz Biotechnology, Entegries, Miele, Hitachi, Supelko, Macherey Nagel, Nikon, Olympus, PBI, R&D Systems, Sanyo, Sigma, Simax, Schott, Agilent, Varian, VWR, Waters, Waldner, Термоприбор, Химлабприбор, Хроматек, ЛАМО и др.

Мы поставляем:

- Химические реактивы, индикаторы, растворители ведущих отечественных и зарубежных производителей для лабораторных и научных исследований.
- Биохимическую продукцию.
- Лабораторное оборудование, приборы, мебель, посуду отечественного и импортного производства для оснащения лабораторий.
- Аналитические приборы и хроматографию.
- Средства дезактивации радиоактивных загрязнений.

Мы стремимся к установлению долгосрочных взаимовыгодных отношений с потребителями и знаем, что наш успех зависит от успешной работы наших партнеров и клиентов.

**МЫ НАДЕЕМСЯ, ЧТО НАША КОМПАНИЯ
СТАНЕТ НЕЗАМЕНИМЫМ ПОМОЩНИКОМ В ВАШЕЙ РАБОТЕ!**

ООО «Химмед-Поволжье»
Региональное представительство
420081, Казань, ул. Седова, д. 22
Тел./факс: (843)273-67-61, 272-97-86
www.chimmed.ru

Центральный офис:
115230, Москва, Каширское шоссе,
д.9, корп.3
тел. (495) 728-41-92

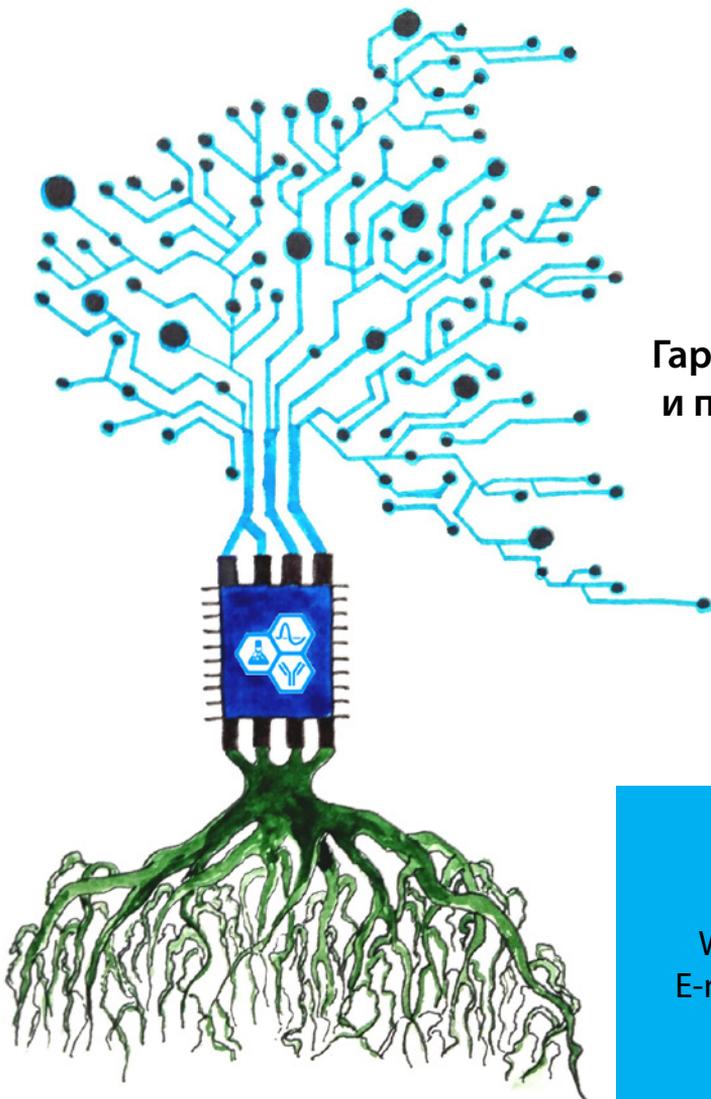
Все элементы решения задачи в одной компании:

**Экспертиза проектов для оптимизации методик
и требуемого оборудования**

**Поставка оборудования
и обучение работы
на нём**

**Гарантийное обслуживание
и постгарантийный ремонт**

**Производство
оборудования.
Контрактные
и серийные разработки**



Адрес: г. Санкт-Петербург,
проспект Тореза 44
Web: www.biotechnologies.ru
E-mail: info@biotechnologies.ru
8 (812) 383-99-41,
8 (812) 294-22-06

Мультиплексный анализ в нейробиологии

Новинка! MILLIPLEX® MAP Human Neuroscience Panel 2

Контролируйте биомаркеры в спинномозговой жидкости (СМЖ), сыворотке, плазме и в образцах клеток и тканей с нашей новой панелью MILLIPLEX® MAP Human Neuroscience Panel 2. Новая панель позволяет выбрать один из или все семь анализов для количественного определения биомаркеров неврологических заболеваний, экономя Ваше время и ценные образцы.

Диапазоны стандартных кривых.

Суточный протокол

Аналит	Диапазон стандартной кривой (пг/мл)	Чувствительность MinDC +2SD (пг/мл)	Precision		Accuracy Overall % Recovery from Human Samples: Плазма (n=5), СМЖ (n=4)
			Intra-Assay (%CV)	Inter-Assay (%CV)	
Angiogenin	2 – 10,000	5.8	<5	<10	97
ApoE4	244 – 1,000,000	162.8	<5	<15	85
FABP3	24 – 100,000	14.3	<5	<10	84
Ferritin	6 – 25,000	6.1	<10	<15	98
Neurogranin	5 – 20,000	19.9	<10	<15	124
PRNP	122 – 500,000	177.0	<5	<10	96
TREM2	15 – 50,000	11.0	<5	<10	94

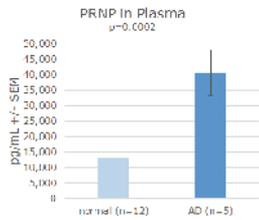
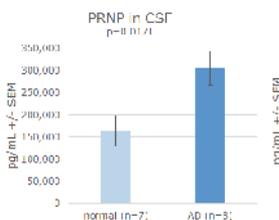
Human Neuroscience Panel 2

(Cat. No. HNS2MAG-95K)

НОВИНКА!

Angiogenin*
ApoE4*
FABP3
Ferritin
Neurogranin
PRNP
TREM2

* Только для образцов сыворотки/плазмы Angiogenin и ApoE4 не мультиплексируются с другими анализами из данной панели.



Human Samples: Human samples were obtained from Biotech. Non-disease (normal) vs. Alzheimer's disease (AD) human cerebrospinal fluid (CSF), plasma or serum were analyzed according to protocol: MILLIPLEX® MAP Human Neuroscience Panel 2 (MSMAG-95K). Shown here are the subset of data for which p-values were <0.05.

Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обращайтесь:

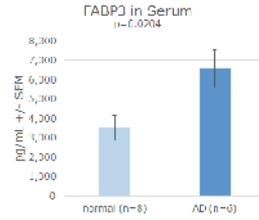
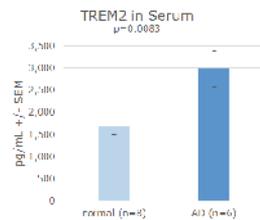
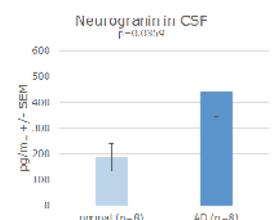
ООО "Мерк"

115054, г. Москва, ул. Валуевая, д. 35

Тел.: +7 495 937-33-04

E-mail: mm.russia@merckgroup.com

sigmaldrich.com/neuroscience



НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НЕЙРОБИОЛОГИИ

Международная конференция
«Актуальные проблемы нейробиологии»
X Всероссийская школа молодых учёных, посвящённая памяти
академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского
Сателлитный симпозиум «От нейрона к мозгу»

Казань, 9–12 сентября 2019 г.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Ответственный редактор Э. А. Бухараева
Редакторы: С. М. Ахмин, В. Ф. Хузахметова
Технический редактор О. Б. Яндуганова
При оформлении обложки использовано фото панорамы Казани
О. Гатиатуллина

Подписано в печать 05.08.19
Бумага офсетная. Печать цифровая
Формат 70x100 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. 14,3
Уч.-изд. л. 8,1. Тираж 200 экз. Заказ 55/8

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательства Казанского университета
420008, г. Казань, ул. Профессора Нужина, 1/37
тел. (843) 233-73-59, 233-73-28

