МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи



Богданов Александр Олегович

Пластичность синапсов соматосенсорной коры и гиппокампа крыс в условиях обогащенной среды: роль астроглии и норадренергической системы

Специальности: 03.03.01 – Физиология

03.03.06 – Нейробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на базе Института живых систем Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Научный руководитель: ***Панкратов Юрий Владимирович,*** *кандидат биологических наук*

Официальные оппоненты: ***Семьянов Алексей Васильевич,*** *доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, отдел молекулярной нейробиологии, главный научный сотрудник и руководитель отдела.*

Туровский Егор Александрович, *кандидат биологических наук, Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», лаборатория внутриклеточной сигнализации, старший научный сотрудник.*

Латанов Александр Васильевич, *доктор биологических наук, профессор, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра высшей нервной деятельности, заведующий кафедрой.*

Защита диссертации состоится 9 ноября 2020 года в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М-1.
E-mail: bellaum@mail.ru
С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «Истина»: https://istina.msu.ru/dissertations/324209395/.
Автореферат разослан «6» октября 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук  Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Изучение молекулярных и клеточных механизмов, за счет которых происходит развитие нейронных сетей мозга в результате взаимодействия с окружающей средой, представляет большой теоретический и практический интерес. В частности, знания о функциональной пластичности используются в регенеративной медицине для реабилитации пациентов перенесших инсульт или травмы мозга, а также для поиска новых подходов для терапии нейродегенеративных заболеваний и продления здорового долголетия [Sun M.K., 2018]. Кроме того, многие принципы работы нейронных сетей головного мозга были заложены в основу разработки самообучающихся сетей используемых для создания искусственного интеллекта. Одним из таких принципов является способность синапсов изменяться в результате собственной активности, которая называется синаптической пластичностью. Современные представления о строении синапсов не ограничиваются лишь знанием о роли пре- и постсинаптической терминали, но также учитывают возможность регуляции синаптической передачи и пластичности глиальными клетками [Семченко В.В. и др., 2014]. Ранее считалось, что роль глиальных клеток мозга заключается лишь в выполнении функций направленных на поддержание гомеостаза нейронных сетей. Однако с открытием способности астроцитов к экзоцитозу везикул с нейромедиаторами стало понятно, что клетки астроглии являются активными элементами ЦНС способными к двусторонней коммуникации с нейронами. Астроциты способны отвечать на глутамат, АТФ и другие нейромедиаторы выделяемые нейронами. В ответ на активность нейронов астроциты Ca^{2+}-зависимым механизмом сами могут высвобождать нейромедиаторы (глутамат, АТФ, D-серин, и др.) в область синаптического контакта и регулировать синаптическую передачу [Bazargani N., Attwell D., 2016]. На сегодняшний день роль астроглии в регуляции синаптической передачи и пластичности синапсов изучена недостаточно.

Одним из экспериментальных подходов, которые позволяют изучать механизмы пластичности нейронных сетей на животных является так называемая «обогащенная среда» (Enriched environment). Известно, что содержание животных в условиях обогащенной среды способствует активному нейрогенезу и синаптогенезу, приводит к утолщению коры головного мозга, а также улучшает пластичность синапсов и когнитивные функции [Baroncelli L. et al., 2010; Тарасова А.Ю. и др., 2017]. Имеются сведения о том, что содержание грызунов в условиях обогащенной среды приводит к увеличению концентрации нейромодулятора норадреналина в некоторых отделах их головного мозга [Naka F. et al., 2002]. Установлено что норадреналин, действуя на адренорецепторы, может модулировать активность нейронов, и играет важную роль в реализации когнитивных функций [Chamberlain S.R., Robbins T.W. 2013]. Однако принимая во внимание тот факт, что норадреналин выделяется в режиме «объемной» передачи информации, то есть непосредственно во внеклеточную среду, логично, что первыми его мишенями могут являться именно астроциты, которые формируют трехмерный каркас для нейронных сетей и контролируют химическое окружение синапсов. Основной массив исследований посвященных изучению действия норадреналина на синаптическую передачу был выполнен еще до открытия регуляторной роли астроглии и без учета клеточной локализации адренорецепторов. Стоит отметить, что на мембране астроцитов присутствует большое количество связанных с Gq-белком α_1-адренорецепторов, которые способны запускать кальциевую сигнализацию и высвобождение регуляторных нейромедиаторов [Chai H. et al., 2017]. Поэтому можно предположить, что улучшение пластичности синапсов и развитие когнитивных способностей животных при их содержании в условиях обогащенной среды происходит в результате действия норадреналина не исключительно на нейроны, но также и на клетки астроглии.

Цель работы: исследовать механизмы, за счет которых обогащенная среда и физические упражнения влияют на синаптическую передачу в соматосенсорной коре и гиппокампе крыс, в

частности определить вклад норадренергической сигнализации на уровне астроглии в регуляцию синаптической пластичности.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние факторов обогащенной среды на плотность норадренергических волокон, синаптическую передачу и пластичность синапсов в гиппокампе и соматосенсорной коре головного мозга крыс;
2. Изучить, каким образом действие норадреналина на астроглию отражается на синаптической передаче и пластичности синапсов в гиппокампе и коре головного мозга крыс;
3. Определить, влияют ли изменения пластичности синапсов у животных, которых содержали в условиях обогащенной среды, на их способности к обучению и формировании памяти;
4. Проверить, возможно ли воспроизвести влияние обогащенной среды на синаптическую передачу, пластичность синапсов и когнитивные способности животных фармакологически при помощи селективного ингибитора обратного захвата норадреналина.

Научная новизна работы

В нашей работе впервые были получены данные об увеличении плотности норадренергических волокон в гиппокампе и соматосенсорной коре головного мозга животных, которых содержали в условиях обогащенной среды.

Впервые при помощи технологии пэтч-кламп было обнаружено, что содержание крыс в условиях обогащенной среды вызывает увеличение частоты миниатюрных постсинаптических НМДА-токов у нейронов соматосенсорной коры головного мозга.

Были получены новые данные, которые характеризуют изменение зависимости индукции долговременной потенциации синапсов гиппокампа и соматосенсорной коры от силы электрической стимуляции при содержании животных в условиях обогащенной среды по сравнению с крысами, жившими в стандартных условиях вивария.

Впервые было исследовано влияние многократного перорального введения крысам малых доз атомоксетина - селективного ингибитора обратного захвата норадреналина на синаптическую передачу, пластичность синапсов и поведение животных.

По результатам экспериментов были получены новые сведения о том, что многократное введение крысам малых доз атомоксетина (0.15 мг/кг массы тела в сутки, в течение 14 дней) вызывает ингибирование тормозной и активацию возбуждающей синаптической передачи в соматосенсорной коре. Также было обнаружено, что малые дозы атомоксетина способствуют облегчению долговременной потенциации синапсов гиппокампа и соматосенсорной коры аналогично тому, что наблюдалось у животных, живших в условиях обогащенной среды.

Более того, нам удалось обнаружить, что многократное введение малых доз атомоксетина животным вызывает увеличение локомоторной активности, улучшает способность крыс к обучению и тренировке пространственной памяти, а также обладает анксиолитическим эффектом.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные нами новые сведения существенно дополняют и углубляют существующие фундаментальные знания о механизмах участвующих в развитии когнитивных способностей при взаимодействии организма с окружающей средой. Было установлено, что богатый индивидуальный опыт, высокий уровень образования и развитые интеллектуальные способности позволяют отсрочить проявление симптомов деменции и нейродегенеративных заболеваний, несмотря на наличие патофизиологических изменений ткани мозга [Russ T.C., 2018]. Согласно современным представлениям в основе этого феномена заключается формирование так называемого «когнитивного резерва» в результате стимуляция развития мозга при взаимодействии с факторами окружающей среды. «Когнитивный резерв»

представляет собой способность мозга компенсировать патологические изменения, как при помощи большего количества нейронов, глиальных клеток и синапсов, так и за счет оптимальной эффективности нейрон-глиальных сетей и высокой метаболической активности клеток мозга [Stern Y., 2012].

Понимание механизмов формирования «когнитивного резерва» мозга за счет улучшения нейрон-глиальных взаимодействий, количества синапсов и их пластичности позволит разработать инновационные подходы для терапии возрастных деменций, нейродегенеративных заболеваний, а также новые методы реабилитации после травм мозга различной этиологии.

Изучение роли нейрон-глиальных взаимодействий в реализации когнитивных функций мозга может способствовать прорыву в разработке математических алгоритмов для самообучающихся нейронных сетей, которые станут основой для создания более совершенного искусственного интеллекта.

Знания о том, каким образом нейромодуляторы-катехоламины осуществляют регуляцию активности нейрон-глиальных сетей и модулируют пластичность синапсов, можно будет использовать для создания фармакологических стимуляторов когнитивных способностей, для разработки новых анксиолитических препаратов, а также для вмешательства в патогенез психических расстройств. В частности, согласно результатам нашего исследования многократное введение малых доз селективного ингибитора обратного захвата норадреналина может способствовать улучшению когнитивных способностей и обладает анксиолитическим эффектом. В перспективе атомоксетин в малых дозировках можно будет использовать в качестве стимулятора когнитивных функций мозга у людей, которым противопоказаны физические нагрузки и занятия спортом, у людей с возрастным снижением когнитивных способностей, а также у людей с высоким уровнем учебной нагрузки и стресса.

Методология и методы исследования

В представленной работе для изучения влияния обогащенной среды на когнитивные способности, синаптическую передачу и пластичность синапсов проводились эксперименты на животных, в ходе которых оценивалась активность исследовательского поведения, а также способность крыс к обучению и формированию памяти с применением теста «открытое поле» и лабиринта К. Барнс. При помощи методов электрофизиологии оценивалась эффективность синаптической передачи, а также способность синапсов к индукции долговременной потенциации. Для изучения роли норадренергической сигнализации в регуляции синаптической пластичности на уровне астроглии были использованы иммуногистохимические методы, технологии флуоресцентной визуализации кальциевой сигнализации в сочетании с фармакологической стимуляцией астроцитов и методами электрофизиологии.

Основные положения, выносимые на защиту диссертации:

1. Содержание крыс в условиях обогащенной среды способствует активному развитию норадренергической системы головного мозга. Норадреналин осуществляет регуляцию активности не только нейронов, но и астроцитов.
2. Взаимодействие норадреналина с α1-адренорецепторами на мембране астроцитов активирует нейрон-глиальные взаимодействия, результатом которых является смещение баланса синаптической передачи в сторону возбуждения, облегчение способности синапсов к индукции долговременной потенциации и улучшение когнитивных функций мозга.
3. Малые дозы селективного ингибитора обратного захвата норадреналина частично воспроизводят те изменения синаптической передачи и пластичности синапсов, которые наблюдаются у крыс, живших в условиях обогащенной среды, а также улучшают их когнитивные способности.

Степень достоверности данных

Достоверность представленных результатов подтверждается использованием современных экспериментальных методов, достаточной величиной выборок животных,

применением адекватных методов статистической обработки. При подготовке обзора литературы и обсуждении результатов использована современная и актуальная литература по теме исследования.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из которых 3 публикации в журналах из списка Scopus и Web of Science и 4 публикации в российских научных журналах и сборниках конференций индексируемых в базе данных РИНЦ.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации были представлены на: V Региональном форуме молодых ученых «ХимБио Seasons» (г. Калининград, 2018); 10-ой Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пущино, Московской области 2019), Mediterranean Neuroscience Conferences Society Meeting, (Marrakesh, Morocco, 2019), 6-ой Международной конференции молодых ученых биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и биотехнологов «OpenBIO» (г. Кольцово, Новосибирской области, 2019).

Апробация диссертации была проведена на заседании ученого совета Института живых систем БФУ им. И. Канта и на заседании кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

Соискатель принимал непосредственное участие на всех этапах исследования. В том числе в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке полученных данных, анализе результатов, подготовке и публикации статей и тезисов докладов, представлял результаты работ на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 165 страницах, содержит 46 рисунков и 10 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов проведенного исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, а также списка литературы, который содержит 300 источников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе Института живых систем БФУ им. И. Канта в два этапа. Все эксперименты были проведены в соответствии с правилами Европейской Конвенции по защите позвоночных животных используемых для экспериментальных и иных научных целей. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Института живых систем БФУ им. И. Канта.

В ходе первого этапа исследования было изучено влияние факторов обогащенной среды на поведение животных, а также их влияние на норадренергическую систему, синаптическую передачу и пластичность синапсов гиппокампа и соматосенсорной коры.

На втором этапе исследования фармакологически моделировали умеренное увеличение концентрации норадреналина в головном мозге животных подобно тому, которое наблюдается при их содержании в условиях обогащенной среды [Naka F. et al., 2002]. Для этого крысам 1 раз в день на протяжении 14 суток перорально вводили малые дозы селективного ингибитора обратного захвата норадреналина (атомоксетин). После чего оценивали изменения в их поведении, а также изменения синаптической передачи и долговременной пластичности синапсов головного мозга.

Объект исследования. Для исследования было использовано 95 крыс линии Wistar, самцы и самки (50/50) в возрасте 3-5 месяцев полученные из SPF питомника «Пущино» Московской области. Было сформировано 3 группы животных: первую группу (контроль), 30 животных, содержали в стандартных условиях вивария по две особи на клетку. Клетки

размером 40×25×18 см, свободный доступ к воде и пище, световой режим 12/12, температура 22±2^{o}C, влажность 60%. Вторую группу, 40 животных, начиная со второго месяца жизни, не менее 8 недель содержали в условиях обогащенной среды. Обогащенная среда представляла собой содержание крыс в клетках с увеличенным размером (75×50×80 см) по 6-8 особей (социальное обогащение), с произвольным доступом к физическим упражнениям: беговое колесо и решетчатые стенки клеток и наличием игрушек различных форм и из различных материалов, а также туннелей и канатов для лазания. При этом производили ежедневную смену самих объектов и их положения в клетках (обогащение за счет новизны). Третью группу, состоящую из 25 крыс, содержали в стандартных условиях вивария по 2 особи на клетку. Для того чтобы проверить возможно ли воспроизвести влияние факторов обогащенной среды на головной мозг путем умеренного увеличения концентрации норадреналина в мозговой ткани, животным третьей группы перорально вводили селективный ингибитор обратного захвата норадреналина (атомоксетин, 0.15 мг/кг массы тела) в течение 14 дней.

Оценка поведения животных в тесте «открытое поле». Тест «открытое поле» проводили в квадратном боксе из белого поливинилхлорида, размеры 100×100×60 см. Крыс помещали в центр бокса и при помощи системы видеотрекинга регистрировали поведение в течение 5 минут. Обработку результатов проводили с использованием ПО Viewer 2.0 (Biobserve GmbH, Германия). Оценивали трек животного в тестовой камере, определяли скорость движения и распределение активности животного в различных зонах открытого поля, а также количество актов дефекации.

Оценка способности животных к обучению и формированию пространственной памяти в лабиринте К. Барнс. Для оценки обучаемости животных и способности формировать пространственную память использовали лабиринт К. Барнс. Установка представляла собой круглый стол высотой 100 см от пола. По краям круглой столешницы диаметром 122 см изготовленной из древесно-стружечной плиты толщиной 1.5 см и покрытой слоем полимерной краски без запаха циркулярно расположены 20 отверстий диаметром 10 см каждое. При этом 19 из 20 отверстий снизу закрыты заглушками из белого органического стекла. Под единственным отверстием, которое не было закрыто заглушкой, помещали небольшое убежище из белого органического стекла, в которое крыса могла проникнуть при его обнаружении. Животным в лабиринте проводили 8 тренировок, по 2 тренировки в день, продолжительностью не более 5 минут каждая. В ходе тренировок крысы учились искать и запоминать место расположения убежища. Поведение животных регистрировали при помощи системы видеотрекинга. Результаты обрабатывали при помощи программы Viewer 2.0. Для оценки способности животных к обучению определяли, с какой скоростью животные находили убежище, длину пути и стратегию поиска убежища. Процедуру тренировок пространственной памяти крыс и оценку используемых стратегий для поиска убежища в лабиринте К. Барнс проводили в соответствии с рекомендациями в публикации [Pitts M.W., 2018].

Приготовление переживающих срезов головного мозга. Анестезию животным производили с использованием изофлурана. В эксикатор с крысой вносили кусочек ваты, смоченный изофлураном. Затем, после того как животное засыпало, производили декапитацию и быстро извлекали головной мозг из черепной коробки. Мозг помещали в ледяной (2-4^{o}C) раствор Кребса, содержащий в мМолях: NaCl 130, KCl 3, $CaCl_2$ 0.5, $MgCl_2$ 2.5, NaH_2PO_4 1, $NaHCO_3$ 25, глюкозу 15, pH 7.4, газированный смесью 95% O_2 + 5% CO_2. Далее на вибрационном микротоме 7000smz (Campden, Великобритания) готовили переживающие срезы головного мозга во фронтальной плоскости в области соматосенсорной коры и области гиппокампа. Толщина срезов 300 мкм. Готовые срезы помещали в специальную камеру в раствор Кребса, содержащий в мМолях: NaCl 130, KCl 3, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1, NaH_2PO_4 1, $NaHCO_3$ 22, глюкозу 15, pH 7.4. Раствор непрерывно газировали смесью 95% O_2 + 5% CO_2. Срезы выдерживали в камере 1.5-2 часа при комнатной температуре до начала электрофизиологических экспериментов.

Исследование синаптической передачи путем регистрации миниатюрных постсинаптических токов. Для регистрации миниатюрных синаптических токов пирамидных

нейронов 2-3 слоя соматосенсорной коры головного мозга использовали технологию пэтч-кламп в конфигурации целая клетка в режиме фиксации напряжения. Регистрацию миниатюрных токов проводили с использованием установки на базе микроскопа BX 51 (Olympus, Япония) с манипулятором MP-225 (Sutter Instrument, США) и усилителя EPC 10 (HEKA Elektronik, Германия). Для оценки тормозной синаптической передачи регистрировали ГАМКа-постсинаптические токи при потенциале мембраны -80 мВ в присутствии блокатора АМПА-рецепторов DNQX (50 мкМ). Исследование возбуждающей синаптической передачи проводили путем регистрации АМПА и НМДА-токов в присутствии блокатора ГАМКа-рецепторов пикротоксина (100 мкМ). Первичную обработку данных производили с использованием программного обеспечения Spectra 5.1 и Origin 6.0 (OriginLab, США).

Фармакологическая стимуляция астроглии для изучения нейрон-глиальных взаимодействий. Для того чтобы исследовать каким образом астроциты регулируют синаптическую передачу и пластичность синапсов были использованы различные фармакологические вещества позволяющие активировать астроглиальную кальциевую сигнализацию. В качестве селективного активатора астроглиальной кальциевой сигнализации был использован пептид TFLLR (10 мкМ). Этот пептид является агонистом PAR-1 рецепторов (рецептор 1 типа, активируемый протеазами), которые в коре головного мозга расположены преимущественно на мембране астроцитов [Junge C.E. et al., 2004]. PAR-1 рецепторы могут быть связаны с различными G-белками: Gi- или Gq-белком. Взаимодействие этих рецепторов с агонистом согласно данным литературы [Shigetomi E. et al., 2008; Lee C.J. et al., 2007] позволяет относительно селективно активировать кальциевую сигнализацию в астроцитах по сравнению с норадреналином, рецепторы к которому имеются как на мембране нейронов, так и глиальных клеток. Для активации кальциевой сигнализации селективно в астроцитах коры головного мозга на срез мозга в течение 2 минут апплицировали TFLLR (10 мкМ) и одновременно оценивали изменения, которые происходят с синаптической передачей нейронов путем регистрации синаптических токов при помощи технологии пэтч-кламп. Чтобы исследовать влияние норадреналина и α1-адренорецепторов на кальциевую сигнализацию в астроцитах на срез мозга в течение 2 минут апплицировали норадреналин (2 мкМ) или селективный агонист α1A-рецепторов (A61803) в концентрации 200 нМ. Одновременно с этим регистрировали изменения, происходящие с синаптической передачей нейронов, или производили флуоресцентную визуализацию Ca^{2+} сигнализации в астроцитах.

Оценка долговременной пластичности синапсов путем регистрации полевых возбуждающих потенциалов и индукции долговременной потенциации. Регистрацию полевых возбуждающих потенциалов (пВПСП) и индукцию долговременной потенциации (ДВП) синапсов в гиппокампе и коре головного мозга производили с использованием установки на базе бинокулярного микроскопа SZ 40 (Olympus, Япония), механических манипуляторов (Newport, Великобритания), ЦАП-АЦП Micro1401 mk II (CED, Великобритания) и усилителя PC-501A (Warner Instruments, США). Кончик стеклянной микропипетки, заполненной внеклеточным раствором Кребса (сопротивление 0.5-1 MΩ) помещали в слой 2-3 соматосенсорной коры. пВПСП вызывали электрической стимуляцией нейронов 5 слоя соматосенсорной коры. Электрическую стимуляцию производили с использованием стимулятора DS2A (Digitimer, Великобритания) и биполярного электрода (WPI, США). Длительность прямоугольного стимула составила 300 мкс. Напряжение на стимуляторе настраивали таким образом, чтобы оно было в 3-4 раза выше, чем минимальный стимул необходимый для возникновения пВПСП в 3 слое соматосенсорной коры. Для индукции ДВП синапсов в коре головного мозга использовали различные стимулы: 10, 20, 30 или 50 высокочастотных Θ-импульсов (Theta burst stimulus, TBS) частотой 100 Гц, продолжительностью по 100 мс каждый с промежутками в 200 мс и задержкой в 10 с после каждых 10 TBS. В гиппокампе пВПСП измеряли, помещая регистрирующий электрод в область Шафферовых коллатералей в CA1 зоне. Стимуляцию при этом производили в CA3 зоне гиппокампа. Для индукции ДВП синапсов в гиппокампе использовали следующие протоколы стимуляции: высокочастотный импульс частотой 100 Гц в течение 1 секунды или

высокочастотный импульс частотой 100 Гц в течение 0.2 секунды, а также 5 и 10 Θ-импульсов. Регистрацию базовой амплитуды пВПСП до стимуляции производили не менее 20 минут и оценивали по увеличению амплитуды пВПСП через 60 минут после стимуляции.

Чтобы оценить влияние норадренергической сигнализации астроглии на пластичность синапсов регистрировали пВПСП и за 3 минуты до электрической стимуляции синапсов на срез мозга в течение 2 минут апплицировали норадреналин (2 мкМ). Затем производили электрическую стимуляцию синапсов и определяли, каким образом норадреналин влияет на индукцию ДВП в исследуемых отделах головного мозга животных.

Для обработки данных использовали программное обеспечение Spectra 5.1 и Origin 6.0. Величину долговременной потенциации синапсов (L) рассчитывали как отношение скорости нарастания пВПСП после стимуляции (K_{LTP}, мкВ/мс) к скорости нарастания пВПСП до стимуляции (K_{BL}, мкВ/мс) и выражали в %. Расчет величины ДВП синапсов может быть описан формулой:

$$\mathbf{L} = \left(\frac{\mathbf{K_{LTP}}}{\boldsymbol{K_{BL}}}\right) \times \mathbf{100}\%$$

Флуоресцентная визуализация Ca^{2+} сигнализации в астроцитах коры головного мозга. Исследование астроглиальной кальциевой сигнализации в динамике производили путем визуализации ионов Ca^{2+} в астроцитах коры головного мозга при помощи флуоресцентного индикатора Rhod-2 AM (Abcam, Великобритания). Время окрашивания срезов головного мозга Rhod-2 AM (1 мкМоль) составило 30 минут, при 33^{o} С. Регистрацию активности кальциевой сигнализации астроцитов выполняли с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия). Анализ кальциевой сигнализации в микродоменах астроцитов проводили при помощи программы ImageJ, Spectra 5.4 и Origin 6.0. Также производили коррекцию латерального смещения фокуса при записи с помощью плагина ImageJ moco [235].

Амплитуду кальциевых транзиентов оценивали как отношение изменения интенсивности флуоресценции региона интереса (ROI) во времени ΔF к изменению интенсивности фоновой флуоресценции ΔF_0 и выражали в процентах:

$$\mathbf{F(t)} = \left(\frac{\boldsymbol{\Delta F(ROI)}}{\boldsymbol{\Delta F_0}}\right) \times \mathbf{100}\%$$

Иммуногистохимическое исследование норадренергической системы. Для проведения иммуногистохимического исследования норадренергической системы фрагмент головного мозга, содержащий соматосенсорную кору и гиппокамп, фиксировали в растворе 4% параформальдегида в течение 24 часов. Далее производили отмывку в растворе фосфатного буфера трижды по 10 минут. Затем заливали фиксированный фрагмент головного мозга в 5% агарозный гель, нагретый до 65^{0}С. Блок агарозы с фрагментом мозга приклеивали к металлической пластине вибрационного микротома Campden 7000smz при помощи суперклея. Нарезали агарозный блок с фрагментом головного мозга на срезы толщиной 5 мкм. Срезы, содержащие соматосенсорную кору и гиппокамп, далее переносили в планшет с 8 лунками, заполненными раствором фосфатного буфера. Перед окрашиванием срезов антителами проводили их обработку 0.3 % тритоном X в течение 10 минут. Далее трижды по 10 минут отмывали срезы в растворе фосфатного буфера. После отмывки выполняли блокировку неспецифического окрашивания срезов при помощи 10% козьей сыворотки в течение 12 часов при +4^{0}С. Срезы вновь трижды по 10 минут отмывали в растворе фосфатного буфера. После отмывки вносили первичные антитела (Millipore mAB308, aDBH, clone 4F10.2) к дофамин-β-гидроксилазе (специфичный маркер норадренергических волокон) в концентрации 1:2000 и оставляли при +4^{0}С на 12 часов. Далее производили отмывку срезов от первичных антител в растворе фосфатного буфера трижды по 10 минут. Затем вносили вторичные антитела, содержащие флуоресцентную метку (Invitrogen, Alexa fluor 488, GAM), в концентрации 1:500 и

оставляли срезы при $+4^0$C на 24 часа. Проводили финальную отмывку срезов в растворе фосфатного буфера трижды по 10 минут. Срезы заключали в препараты при помощи среды, содержащей краситель к DAPI (окрашивание ядер клеток). Все использованные в исследовании антитела были закуплены у фирмы Abcam (Великобритания). После заключения срезов в препараты покровное стекло по краям проклеивали бесцветным лаком для герметизации. Для визуализации флуоресцентного окрашивания срезов и получения изображений использовали конфокальный микроскоп LSM 780 (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения далее анализировали при помощи программы ImageJ. Для анализа использовали встроенные плагины ImageJ позволяющие контрастировать объекты и анализировать частицы (particle analysis). На полученных изображениях подсчитывали площадь, которую занимали норадренергические волокна (S_{NA}) относительно общей площади области исследования (S_{ROI}), выражали в процентах и нормировали на количество ядер клеток (Qn) к площади области исследования. Результат представлен в виде условных единиц плотности норадренергических волокон в гиппокампе и соматосенсорной коре головного мозга.

Расчет плотности норадренергических волокон (P_{NA}) в исследуемых отделах головного мозга животных может быть описан формулой:

$$\mathbf{P_{NA}} = \left(\left(\frac{\boldsymbol{S_{NA}}}{\boldsymbol{S_{ROI}}}\right) \times \mathbf{100\%}\right) \times \left(\frac{\boldsymbol{Qn}}{\boldsymbol{S_{ROI}}}\right)$$

Статистическая обработка данных. В ходе исследования каждый переживающий срез головного мозга был использован для получения только одной записи эксперимента (например, регистрация пВПСП, запись миниатюрных постсинаптических токов или флуоресцентная визуализация Ca^{2+} в одном астроците), таким образом, число n равно количеству срезов мозга, на которых проводились эксперименты. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 17, GraphPad Prism 5, Origin 6.0, Spectra 5.1. Проверку данных на соответствие нормальному закону распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Описательные статистики данных, распределенных по нормальному закону, представлены в виде среднего и стандартного отклонения (M±SD). Данные, распределенные по законам отличным от нормального, представлены в виде медианы и квартилей (Me(Q1-Q3)). Для сравнения данных с нормальным распределением использовали параметрический критерий t-Стьюдента. В том случае если данные были распределены по закону, отличному от нормального, для сравнения применяли U-критерий Манна-Уитни. Для оценки квантового размера миниатюрных постсинаптических токов нейронов анализировали функции плотности вероятности распределения данных при помощи метода максимального правдоподобия. Дополнительно уточняли амплитуду токов с использованием автокорреляционного анализа.

Различия между группами сравнения считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$. Для всех результатов, где были определены статистически значимые различия, мощность статистических критериев составила 0.7-0.9.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Факторы обогащенной среды способствуют развитию норадренергической системы головного мозга

На первом этапе исследования мы при помощи иммуногистохимического исследования оценили, каким образом факторы обогащенной среды влияют на количество норадренергических волокон в гиппокампе и соматосенсорной коре головного мозга крыс.

Оказалось, что после 8 недель содержания животных в условиях обогащенной среды плотность норадренергических волокон в CA 1 регионе гиппокампа (1.04±0.13 у.е., n=15) животных увеличивается по сравнению с гиппокампом крыс, живших в стандартных условиях вивария (0.90±0.08 у.е., n=10), p=0.047 (Рис.1; А, Б). Аналогичным образом обогащенная среда

вызывала увеличение плотности терминалей аксонов норадренергических нейронов в слое 2/3 соматосенсорной коры головного мозга (1.91±0.36 у.е., n=15) по сравнению с животными контрольной группы (1.53±0.15 у.е., n=10), p=0.028 (Рис.1; В, Г). Кроме того, плотность норадренергических волокон в слое 2/3 соматосенсорной коры (1.53±0.15 у.е., n=10) оказалась значительно выше, чем в CA1 регионе гиппокампа (0.90±0.08 у.е., n=10), p<0.001 (Рис.1).

По результатам иммуногистохимического исследования нам удалось обнаружить, что содержание животных в условиях обогащенной среды стимулирует активное развитие норадренергической системы головного мозга. Наши данные подтверждают полученные другими исследовательскими группами результаты о том, что факторы обогащенной среды вызывают увеличение концентрации норадреналина в головном мозге [Naka F. et al., 2002; Galani R. et al., 2007]. Увеличение концентрации норадреналина может быть обусловлено большей плотностью терминалей аксонов норадренергических нейронов и, соответственно, высвобождением большего количества квантов этого нейромедиатора. Мы также обнаружили, что плотность норадренергических волокон в соматосенсорной коре значительно выше, чем в CA 1 регионе гиппокампа. Этот результат полностью согласуется с теми данными, которые были получены при исследовании анатомии норадренергической системы и плотности иннервации различных отделов головного мозга [Ermine C.M. et al., 2016; Agster K.L. et al., 2013], что подтверждает адекватность примененного нами метода исследования.

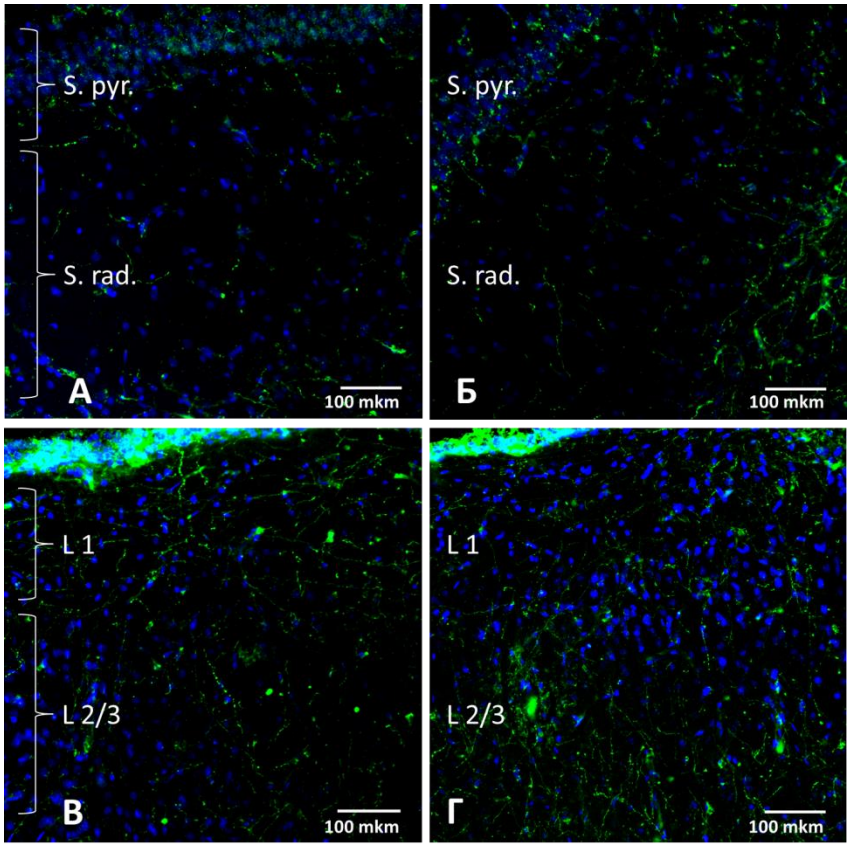


Рисунок 1. Норадренергические волокна в гиппокампе (CA 1 зона) и соматосенсорной коре, окрашены флуоресцентными антителами к дофамин-β-гидроксилазе (зеленым), ядра нейронов и глии окрашены DAPI (синим). Где: А и Б – гиппокамп крысы, жившей в стандартных условиях вивария и животного, которое содержали в условиях обогащенной среды. В и Г - соматосенсорная кора крысы, которая жила в стандартных условиях и животного, которое содержали в условиях обогащенной среды, соответственно. S. pyr. – *Stratum pyramidale*, S. rad. – *Stratum radiatum* в CA1 зоне гиппокампа. L1 – слой 1 соматосенсорной коры, L 2/3 – слой 2/3 соматосенсорной коры.

Обогащенная среда и атомоксетин ингибируют тормозную синаптическую передачу в коре головного мозга

Для оценки изменений, которые происходят с тормозной синаптической передачей в коре головного мозга при содержании животных в условиях обогащенной среды или под действием атомоксетина, мы при помощи технологии пэтч-кламп регистрировали миниатюрные ингибирующие постсинаптические токи (мИПСТ), возникающие при активации ГАМКа-рецепторов (Рис.2).

Нам удалось обнаружить, что содержание животных в условиях обогащенной среды приводит к снижению амплитуды мИПСТ (28.45±7.94 пА, n=37) по сравнению с контрольной

группой (36.6±10.36 пА, n=14, p=0.0042). Аналогичным образом, курс ингибитора обратного захвата норадреналина вызвал снижение амплитуды ГАМКа-токов нейронов коры головного мозга животных (25.43±8.02 пА, n=13) по сравнению с крысами, жившими в стандартных условиях вивария (36.6±10.36 пА, n=14, p=0.0046). Различий амплитуды ГАМКа-токов у животных, живших в условиях обогащенной среды, и у крыс после курса атомоксетина выявлено не было.

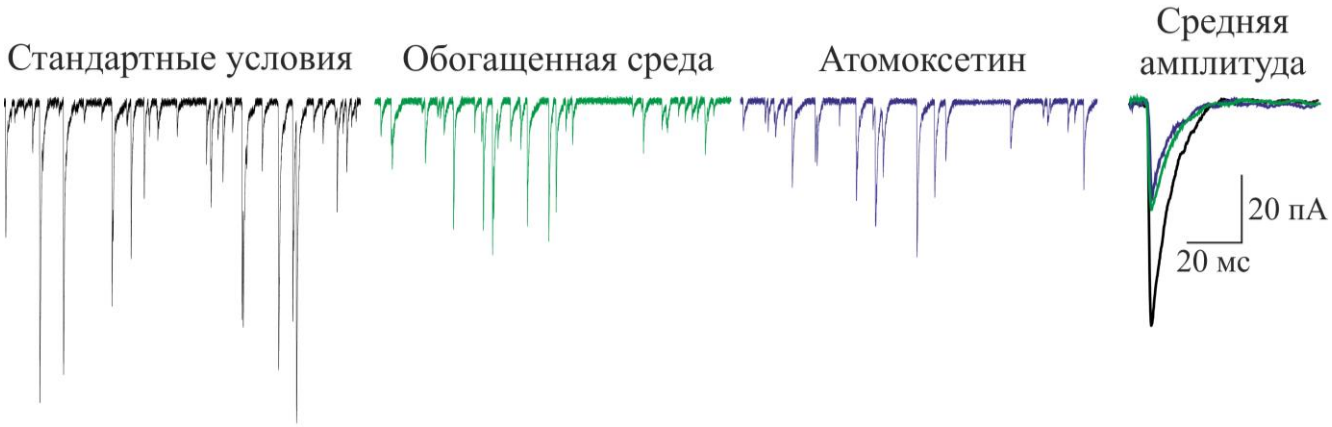


Рисунок 2. Записи мИПСТ, возникающих в результате активации ГАМКа-рецепторов нейронов 2/3 слоя соматосенсорной коры головного мозга крыс, живших в стандартных условиях вивария; крыс, которых содержали в условиях обогащенной среды и животных, которым вводили малые дозы атомоксетина.

Полученные результаты полностью подтверждают тот факт, что обогащенная среда ингибирует тормозную синаптическую передачу нейронов соматосенсорной коры головного мозга. Пероральное введение животным ингибитора обратного захвата норадреналина в течение 14 дней аналогичным образом вызвало снижение амплитуды тормозных постсинаптических токов в соматосенсорной коре головного мозга животных. Такой результат вкупе с увеличением плотности норадренергических волокон в коре головного мозга свидетельствует о важной роли норадреналина в ингибировании тормозной синаптической передачи при содержании животных в условиях обогащенной среды. Нам удалось найти несколько публикаций, в которых также было обнаружено, что содержание животных в условиях обогащенной среды вызывает ингибирование тормозной синаптической передачи в коре головного мозга [Begenisic T. et al., 2011; Sale A. et al., 2007; Alwis D.S., Rajan R., 2013]. Так, было установлено, что обогащенная среда улучшает пространственную память у мышей с моделью синдрома Дауна за счет ингибирования тормозной синаптической передачи в коре головного мозга [Begenisic T. et al., 2011]. Согласно существующим сведениям главной причиной, по которой происходит уменьшение амплитуды тормозных токов, является уменьшение плотности ГАМКа-рецепторов на постсинаптической мембране и снижение синтеза субъединиц ГАМКа-рецепторов [Zhou X. et al., 2011].

Норадреналин активирует кальциевую сигнализацию в астроцитах

Чтобы подтвердить способность норадреналина активировать кальциевую сигнализацию в астроцитах за счет действия на α1-адренорецепторы, мы апплицировали на переживающий срез мозга норадреналин (2 мкМ) или селективный агонист α1А-адренорецепторов (А61603, 200 нМ) и производили флуоресцентную визуализацию ионов Ca^{2+} с использованием красителя Rhod-2 AM, 1 мкМ (Рис.3).

Мы регистрировали спонтанные кальциевые транзиенты в соме и отростках астроцитов коры головного мозга у животных контрольной группы. В покое, до аппликации норадреналина или А61603, во всех экспериментах астроциты проявляли спонтанную активность кальциевой сигнализации. Средняя частота возникновения спонтанных кальциевых транзиентов в соме и отростках клеток составила 0.17±0.06 Гц. Средняя амплитуда спонтанных кальциевых транзиентов в астроцитах коры головного мозга в покое составила 20.55±7.54%. При

аппликации на срез норадреналина (2 мкМ) амплитуда и частота кальциевых транзиентов в астроцитах резко возрастала. Амплитуда индуцированных норадреналином Ca^{2+}-транзиентов составила 183.81±44.10% по сравнению с амплитудой транзиентов до стимуляции (амплитуду Ca^{2+}-транзиентов до стимуляции принимали за 100%), n=12, p=0.0001. Частота кальциевых транзиентов в астроцитах при аппликации норадреналина возрастала до 189.31±68.17% по сравнению с частотой в покое (частоту Ca^{2+}- транзиентов в покое принимали за 100%), n=12, p=0.0001.

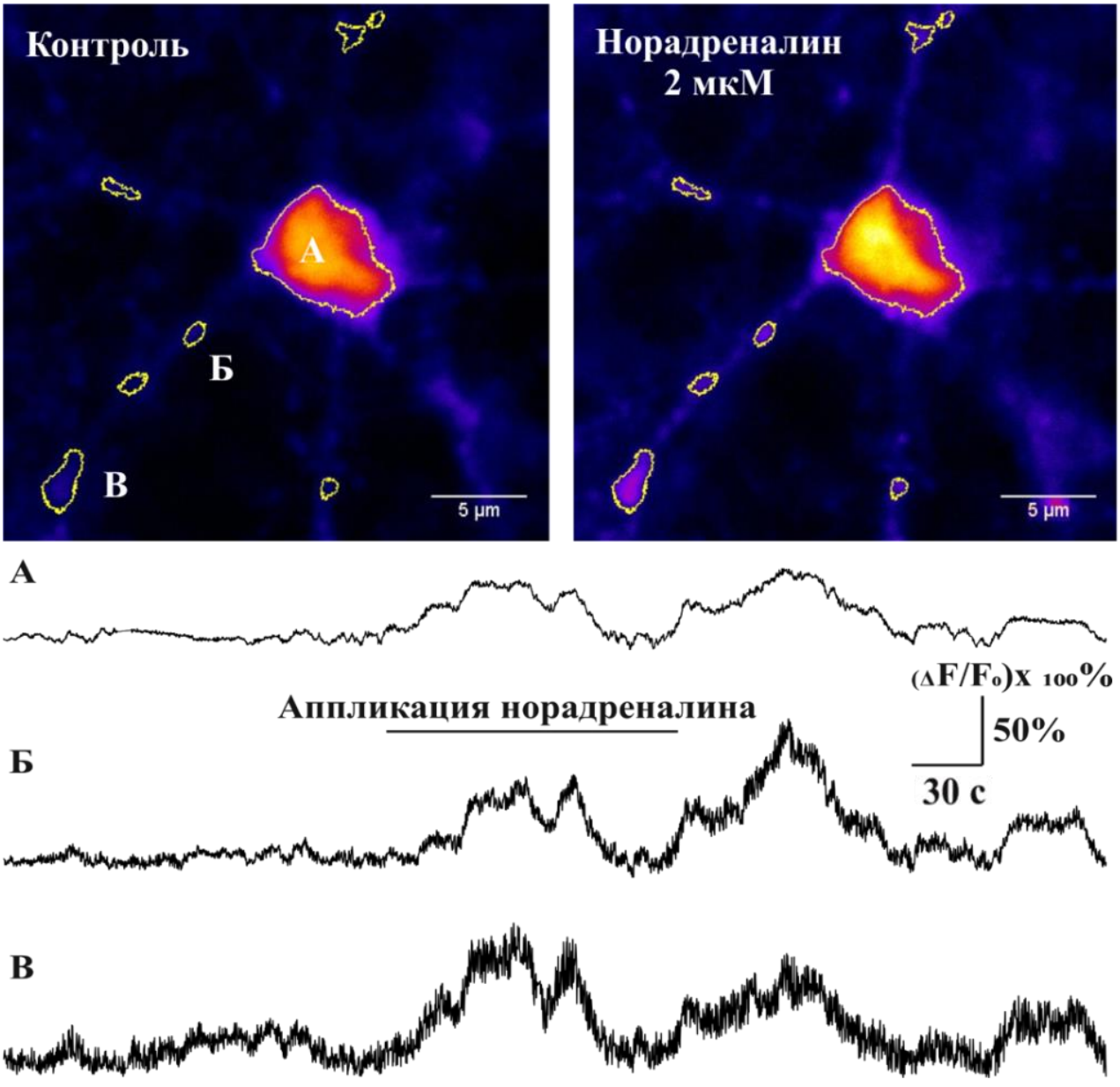


Рисунок 3. Аппликация норадреналина (2 мкМ) на срез активирует кальциевую сигнализацию в астроцитах коры головного мозга. Где А - сома астроцита, Б и В – микродомены в отростках клетки.

Аппликация на срез А61603 (200 нМ) селективного агониста α1А-адренорецепторов аналогичным образом вызывала увеличение амплитуды и частоты кальциевых транзиентов в микродоменах астроцитов. При аппликации А61603 (200 нМ) амплитуда кальциевых транзиентов в астроцитах составила 198.89±49.64% по сравнению с амплитудой транзиентов в покое, n=10, p=0.0001. Частота кальциевых транзиентов в астроцитах под действием А61603 возросла до 205.70±99.14% по сравнению с частотой возникновения кальциевых транзиентов до аппликации агониста α1А-адренорецепторов, n=10, p=0.0001. Возбуждающее действие

норадреналина и вещества A61603 на кальциевую сигнализацию в астроцитах было обратимым: в течение 7-12 минут после прекращения аппликации агонистов адренорецепторов частота и амплитуда кальциевых транзиентов возвращалась к исходным показателям.

Таким образом, результаты наших экспериментов подтвердили, что аппликация норадреналина действительно активирует кальциевую сигнализацию в астроцитах коры головного мозга. Действие селективного агониста α1A-адренорецепторов на кальциевую сигнализацию в астроцитах аналогично эффекту норадреналина. В соответствии с результатами исследований, представленными в литературе, блокада α1-адренорецепторов теразозином полностью исключает влияние норадреналина на кальциевую сигнализацию в астроцитах [Lalo U., Pankratov Y., 2017]. Очевидно, что α1-адренорецепторы играют доминирующую роль в индукции кальциевой сигнализации в астроцитах. Несомненно, на мембране астроцитов имеются α2- и β-адренорецепторы, внутриклеточные эффекты которых реализуются за счет Gi- и Gs-белков, однако, действие норадреналина на эти рецепторы не является триггером для активации кальциевой сигнализации, но может играть роль ее регулятора [Zorec R. et al., 2017].

Норадреналин стимулирует нейрон-глиальные взаимодействия, ингибирует тормозную и потенцирует возбуждающую синаптическую передачу

Принимая во внимание тот факт, что содержание животных в условиях обогащенной среды способствует активному развитию норадренергической системы головного мозга, мы предположили, что норадреналин будет влиять не только непосредственно на нейроны, но также на нейрон-глиальные взаимодействия, активируя α1-адренорецепторы на мембране астроцитов. Для того чтобы оценить каким образом активация кальциевой сигнализации астроцитов отразится на тормозной синаптической передаче нейронов, мы активировали адренорецепторы астроцитов путем аппликации на срез мозга норадреналина (2 мкМ) и одновременно регистрировали миниатюрные постсинаптические токи нейронов при помощи технологии пэтч-кламп.

В результате активации астроглиальных адренорецепторов при аппликации на срез норадреналина происходило ингибирование тормозной синаптической передачи в соматосенсорной коре головного мозга (Рис.4).

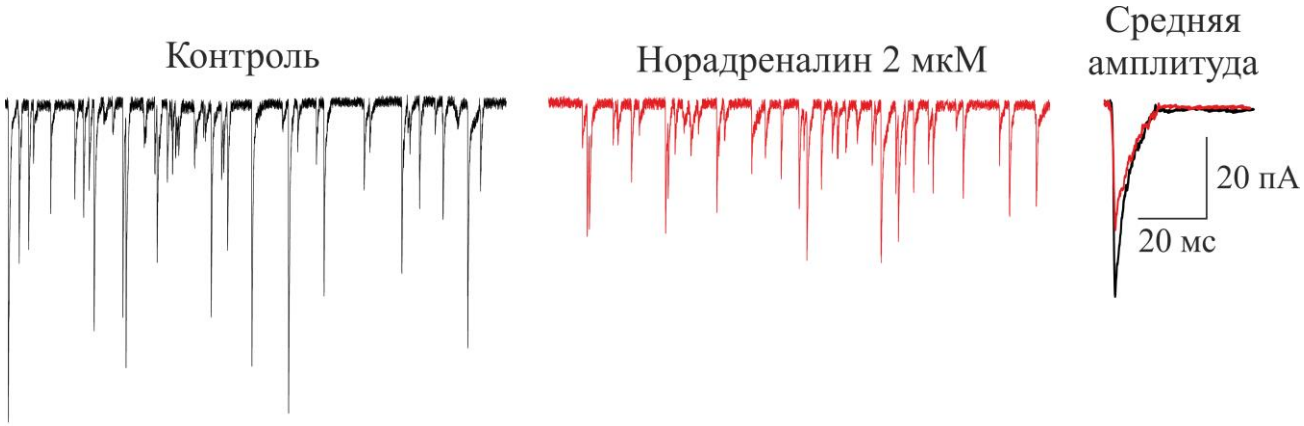


Рисунок 4. Влияние активации астроглиальных адренорецепторов норадреналином (2 мкМ) на тормозную синаптическую передачу в соматосенсорной коре головного мозга. Контроль - ГАМКа мИПСТ до стимуляции астроглии, а также ГАМКа-токи во время стимуляции астроцитов норадреналином.

Норадреналин вызывал временное уменьшение квантового размера постсинаптических ГАМКа-токов. Квантовый размер мИПСТ при аппликации норадреналина составил 81.48±5.12 % от среднего квантового размера до стимуляции, n=8, p=0,001. Аппликация норадреналина на срез мозга не повлияла существенно на частоту ГАМКа мИПСТ. Частота мИПСТ при аппликации на срез норадреналина составила 93.44±6.19% от частоты до стимуляции, n=8, p=0,18. Этот факт указывает на то, что механизм действия норадреналина направлен, прежде

всего, на постсинаптическую мембрану и практически не влияет на вероятность слияния везикул нейромедиатора с мембраной пресинаптической терминали.

При аппликации на срез норадреналина (2 мкМ) мы наблюдали временное увеличение эффективности возбуждающей синаптической передачи обусловленной АМПА-рецепторами (Рис.5). По результатам оценки эффективности синаптической передачи при аппликации норадреналина на срез мозга, квантовый размер АМПА мВПСТ составил 127.14±11.99% от среднего квантового размера АМПА-токов до стимуляции, n=8, p=0.001. Норадреналин практически не повлиял на частоту возникновения АМПА-токов. Частота мВПСТ при аппликации на срез норадреналина составила 102.15±6.46% от частоты АМПА-токов до аппликации норадреналина, n=8, p=0,34. Такое слабое влияние норадреналина на частоту АМПА мВПСТ свидетельствует о преимущественно постсинаптическом механизме изменения эффективности возбуждающей синаптической передачи.

Мы предположили, что механизмы, за счет которых норадреналин ингибирует тормозную и потенцирует возбуждающую синаптическую передачу нейронов, реализуются за счет активации астроглиальных α1-адренорецепторов. Согласно последним данным, α1-адренорецепторы в коре головного мозга преимущественно экспрессируются астроцитами, а не нейронами. Этот тип адренорецепторов обладает очень высокой чувствительностью к норадреналину (EC_{50} равна 370 нМ) и первым будет активироваться при аппликации норадреналина на срез мозга [Lalo U., Pankratov Y., 2017]. Стимуляция связанных с Gq-белком α1-адренорецепторов, активирует кальциевую сигнализацию в астроцитах, которая служит триггером высвобождения глиотрансмиттеров, таких как глутамат, АТФ и D-серин. Глиотрансмиттеры в свою очередь могут ингибировать тормозную и потенцировать возбуждающую синаптическую передачу нейронов. АТФ может действовать на внесинаптические P2X-пуринорецепторы, обеспечивая приток ионов Ca^{2+} в цитозоль нейрона. Увеличение концентрации Ca^{2+} в тормозных синапсах активирует Ca^{2+}/кальмодулинзависимую протеинкиназу II, которая фосфорилирует ГАМКа-рецепторы и уменьшает время, в течение которого канал рецептора остается открытым при взаимодействии с агонистом [Nakamura Y. et al., 2015]. В отличие от тормозных синапсов, где фосфорилирование ГАМКа-рецепторов вызывает ингибирование тормозной синаптической передачи, в возбуждающих синапсах происходит активация сигнального пути фосфоинозитид-3-киназы или CaMKII и фосфорилирование АМПА-рецепторов, которое сопровождается увеличением эффективности возбуждающей синаптической передачи [Hu H. et al., 2007; Gordon G.R.J. et al., 2005].

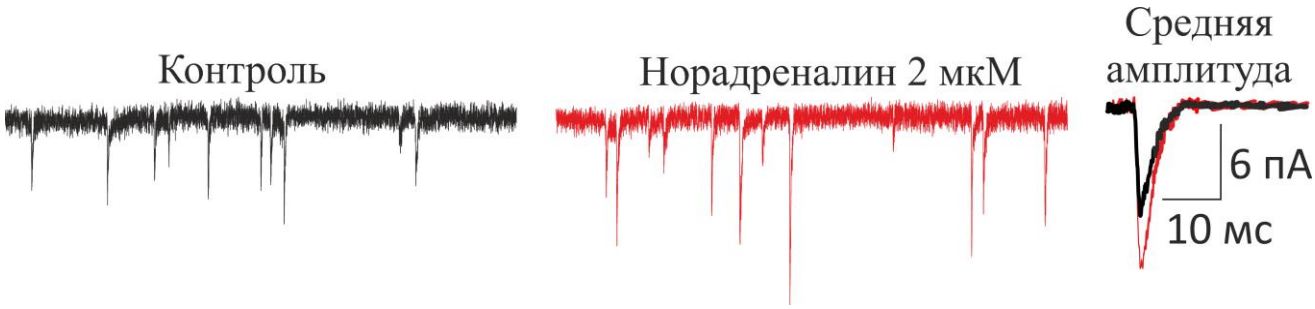


Рисунок 5. Влияние норадреналина (2 мкМ) на возбуждающую синаптическую передачу, обусловленную АМПА-рецепторами нейронов 2/3 слоя соматосенсорной коры головного мозга. Контроль - АМПА мВПСТ до стимуляции астроглии, а также АМПА-токи после аппликации на срез норадреналина 2 мкМ.

В литературе имеются данные, которые согласуются с нашими результатами. Было показано, что астроциты могут регулировать торможение в коре головного мозга путем экзоцитиоза везикул, содержащих АТФ [Lalo U. et al., 2014]. При помощи микроэлектродных сенсоров было обнаружено, что у трансгенных мышей, у которых был нарушен экзоцитоз везикул селективно из астроцитов, высвобождение АТФ и D-серина из астроцитов снижалось, что сопровождалось уменьшением пластичности синапсов в ответ на стимулы различной силы

[Lalo U., Pankratov Y., 2017, Lalo U. et al., 2018]. Имеются данные о том, что глутамат и АТФ также может высвобождаться из астроцитов невезикулярным путем при помощи, например, коннексонов или каналов типа Best1 или TREK-1 [Kang J. et al., 2008; Woo D.H. et al., 2012; Karagiannis A. et al., 2016].

Для того чтобы убедиться что действие норадреналина на возбуждающую синаптическую передачу реализуется за счет АТФ, который высвобождается астроцитами мы оценили изменения пуринергической сигнализации в синапсах под действием норадреналина. При помощи пэтч-кламп регистрировали мВПСТ, возникающие в результате активации P2X-пуринорецепторов АТФ, в присутствии блокаторов ГАМКа, АМПА и НМДА-рецепторов и апплицировали на срез норадреналин (2 мкМ). Аппликация на срез норадреналина вызывала резкое увеличение частоты P2X-токов (Рис.6). Частота P2X мВПСТ под действием норадреналина составила 169.72±31.55% по сравнению с частотой P2X-токов до аппликации, n=6, p=0.0001. При этом квантовый размер P2X-токов уменьшился, составив 73.28±12.76% от квантового размера P2X мВПСТ до аппликации норадреналина, n=6, p=0.0002. В то же время, возникающие под действием норадреналина низкоамплитудные P2X-токи, характеризовались более медленной кинетикой по сравнению с P2X мВПСТ до аппликации норадреналина. Tdecay P2X мВПСТ при аппликации норадреналина составила 125.48±9.34% по сравнению с Tdecay P2X-токов до аппликации, n=6, p=0.0014.

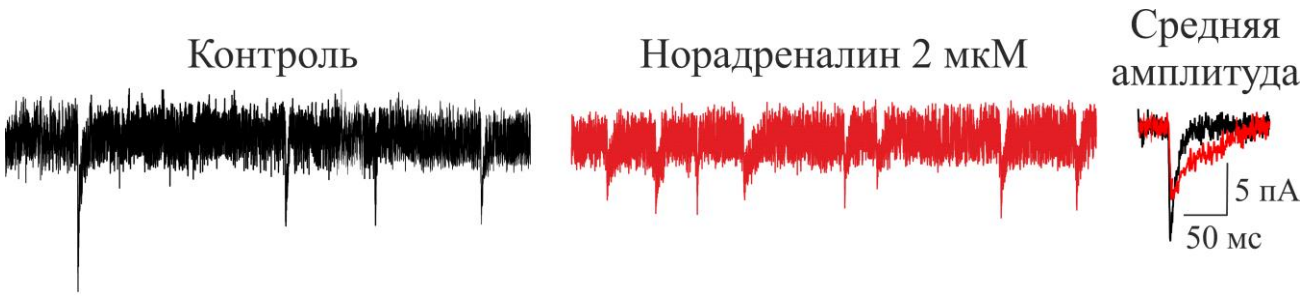


Рисунок 6. Влияние норадреналина (2 мкМ) на пуринергическую сигнализацию в синапсе, обусловленную активацией P2X-рецепторов нейронов 2/3 слоя соматосенсорной коры головного мозга. Контроль - P2X мВПСТ до стимуляции астроглии, а также P2X-токи после аппликации на срез норадреналина.

Мы полагаем, что появление большого количества низкоамплитудных P2X-токов с медленной кинетикой под действием норадреналина отражает именно везикулярное высвобождение АТФ из астроцитов. Медленная кинетика наблюдаемых нами P2X-токов глиальной природы, обусловлена, прежде всего, комплексом белков SNARE, которые отвечают за слияние везикул с мембраной астроцита. По сравнению с кинетикой экзоцитоза в нейронах, экзоцитоз астроглиальных везикул происходит значительно медленнее, поэтому мы наблюдаем более медленные P2X мВПСТ [Verkhratsky A., Nedergaard M., 2018]. Низкая амплитуда миниатюрных пуринергических токов, которые возникают под действием норадреналина, обусловлена низкой плотностью внесинаптических P2X-рецепторов. Еще одной причиной низкой амплитуды внесинаптических P2X-токов является тот факт, что концентрация АТФ высвобождающегося из астроцитов во внеклеточное пространство снижается в результате диффузии [Khakh B.S., North R.A., 2012].

Мы также обнаружили, что помимо миниатюрных постсинаптических токов в записях присутствуют входящие токи глиальной природы, которые характеризуются очень медленной кинетикой: 60-1500 миллисекунд и амплитудой 10-500 пА (Рис.7). В литературных источниках имеются данные о возникновении медленных входящих токов при регистрации активности нейронов в различных отделах головного мозга методом пэтч-кламп. Согласно современным представлениям медленные входящие токи имеют глиальную природу. Наличие медленных токов было объяснено тем, что астроциты выделяют глутамат и D-серин, тем самым активируя внесинаптические НМДА-рецепторы (содержат NR2B субъединицы, обеспечивающие Mg^{2+} блок рецептора при мембранном потенциале -80 мВ), которые вызывают медленные входящие

кальциевые токи в нейронах [Kovács A., Pál B., 2017]. Хотя физиологическая роль этих феноменов до конца не ясна, медленные токи, индуцированные астроцитами, являются отражением нейрон-глиальных взаимодействий и могут играть важную роль в нормальной физиологии головного мозга.

В нашем исследовании у большинства нейронов мы регистрировали возникновение медленных входящих токов с низкой частотой (частота 0.035±0.032 Гц, n=12). При аппликации на срез норадреналина частота медленных входящих токов резко возрастала (0.142±0.063 Гц, n=11, p=0.001) по сравнению с частотой до стимуляции. Мы полагаем, что под действием норадреналина из астроцитов более интенсивно высвобождается глутамат и D-серин, которые действует на НМДА-рецепторы, вызывая медленные входящие токи. Аппликация на срез мозга блокатора НМДА-рецепторов D-AP5 (30 мкМ) полностью ингибировала возникновение медленных входящих токов глиальной природы.

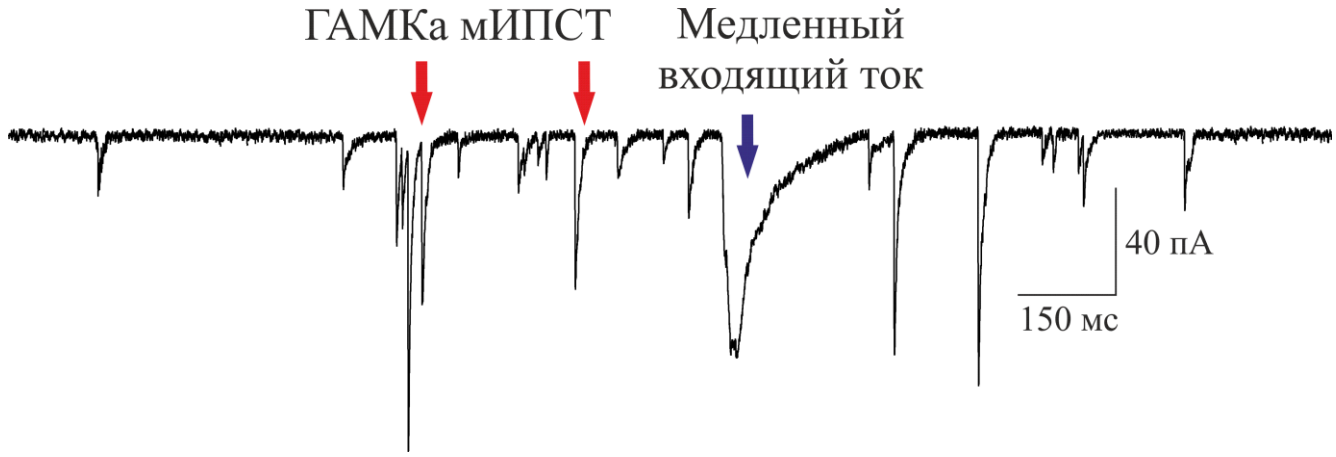


Рисунок 7. Норадреналин активирует нейрон-глиальные взаимодействия, вызывая возникновение медленных входящих токов у нейронов за счет высвобождения астроцитами глутамата и D-серина.

Таким образом, норадреналин индуцирует нейрон-глиальные взаимодействия и осуществляет регуляцию эффективности тормозной и возбуждающей синаптической передачи за счет активации астроглиальной кальциевой сигнализации и высвобождения глиотрансмиттеров, таких как АТФ, глутамат и D-серин. Исходя из совокупности полученных результатов, мы можем сделать вывод о том, что физиологическое действие норадреналина заключается в смещении баланса синаптической передачи в сторону возбуждения и реализуется при активном участии астроцитов.

Норадреналин смещает баланс синаптической передачи в сторону возбуждения и облегчает индукцию долговременной потенциации синапсов

Для того чтобы проверить вызывает ли естественное повышение концентрации норадреналина в головном мозге животных при их содержании в условиях обогащенной среды изменение долговременной пластичности синапсов, мы регистрировали пВПСП в гиппокампе и соматосенсорной коре, а затем индуцировали ДВП синапсов при помощи электрических стимулов.

По результатам оценки пластичности синапсов стало известно, что у животных, которых содержали в условиях обогащенной среды, в ответ на стимулы умеренной силы (30 Ѳ-импульсов) происходит индукция ДВП синапсов соматосенсорной коры на значительно более высоком уровне по сравнению с крысами контрольной группы (Рис.8; А). Аналогичным образом факторы обогащенной среды способствовали облегчению индукции ДВП синапсов в гиппокампе в ответ на стимул 100 Гц, продолжительностью 1 секунду. (Рис.8; Б). При аппликации норадреналина (2 мкМ) на срез мозга животных контрольной группы стимулы умеренной силы индуцировали ДВП синапсов соматосенсорной коры и гиппокампа на уровне аналогичном животным, которых содержали в условиях обогащенной среды (Рис. 8).

Аппликация норадреналина (2 мкМ) на срез мозга крыс, которых содержали в условиях обогащенной среды, вызвала дополнительное увеличение ДВП синапсов соматосенсорной коры в ответ на 30 Ѳ-импульсов (Рис.8; А).

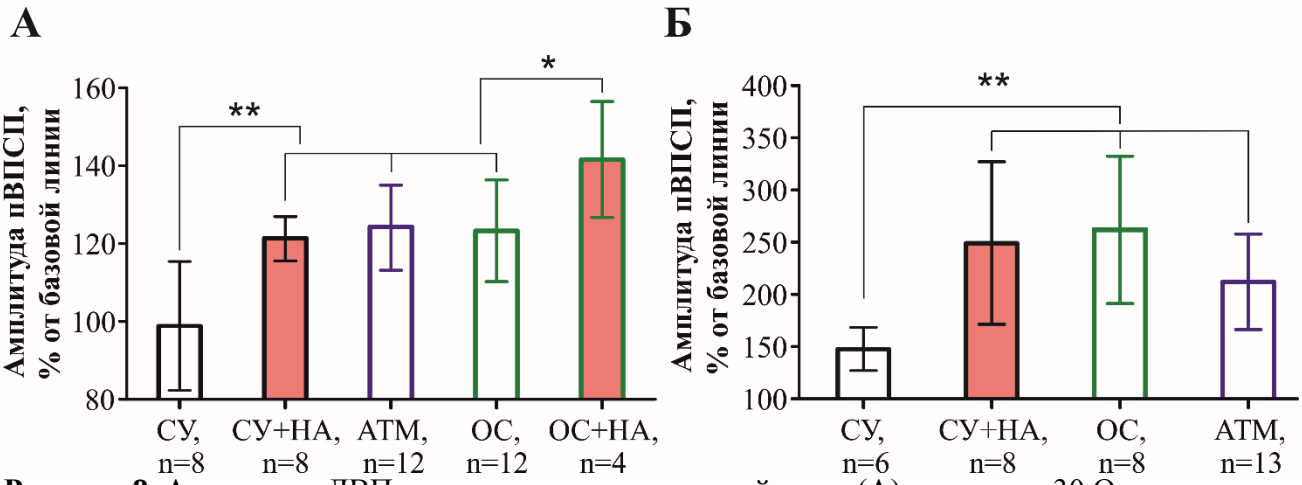


Рисунок 8. Амплитуда ДВП синапсов соматосенсорной коры (А) в ответ на 30 Ѳ-импульсов и ДВП синапсов гиппокампа (Б) в ответ на стимул 100 Гц, продолжительностью 1 секунду. Где *- $p \leq 0.05$, **- $p \leq 0.01$. СУ – стандартные условия содержания, СУ+НА – стандартные условия и аппликация норадреналина на срез мозга, АТМ – курс атомоксетина, ОС и ОС+НА – обогащенная среда и обогащенная среда с аппликацией норадреналина на срез мозга, соответственно.

Введение животным малых доз селективного ингибитора обратного захвата норадреналина вызвало аналогичное увеличение амплитуды ДВП синапсов гиппокампа и соматосенсорной коры в ответ на стимулы умеренной силы до уровня, который наблюдался у крыс, живших в условиях обогащенной среды (Рис.8).

Таким образом, факторы обогащенной среды способствуют облегчению индукции ДВП синапсов гиппокампа и соматосенсорной коры головного мозга в ответ на стимулы умеренной силы. Аппликация экзогенного норадреналина (2 мкМ) на срезы головного мозга животных или пероральное введение крысам малых доз атомоксетина отчасти воспроизводит эффекты содержания животных в условиях обогащенной среды на долговременную пластичность синапсов. В частности, норадреналин способен активировать нейрон-глиальные взаимодействия, смещать баланс синаптической передачи в сторону возбуждения и облегчать индукцию ДВП синапсов до уровня, который наблюдается у животных, живших в условиях обогащенной среды.

Норадреналин увеличивает локомоторную активность и индуцирует активное исследовательское поведение животных в тесте «открытое поле»

Для того чтобы выяснить влияют ли на поведение животных те изменения долговременной пластичности синапсов, которые нам удалось обнаружить у крыс, живших в условиях обогащенной среды, и у животных, которым вводили атомоксетин, мы использовали тест «открытое поле». В качестве показателей для исследования поведения животных мы оценивали длину трека в различных зонах бокса (центр, у стенок, углы), время, в течение которого животные находились в различных зонах «открытого поля», скорость движения животных, активность в разных зонах бокса, а также количество фекалий в качестве маркера уровня стресса и эмоциональной реакции.

Поведение и трек животных, которых содержали в условиях обогащенной среды, значительно отличалось от животных контрольной группы. При оценке поведения животных, живших в стандартных условиях вивария, мы обратили внимание на то, что при помещении крыс в центр «открытого поля» в начале эксперимента они нередко замирали и долго не покидали эту зону, далее двигались преимущественно у стенок или сидели в углах бокса (Рис.9;

А). Наблюдаемое нами замирание животных, вытягивание головы, нерешительное движение, вращение вокруг своей оси и активный груминг являются общепризнанными признаками стресса и тревоги грызунов в тесте открытое поле [Gould T.D. et al., 2009]. В отличие от контрольной группы, когда крыс, живших в условиях обогащенной среды, помещали в центральную область, они практически без задержки ее покидали и начинали исследовать углы и стенки бокса. Крысы, которых содержали в условиях обогащенной среды, предпочитали более активно обследовать стенки бокса (активность 63.08±16.33%, n=26) по сравнению с контрольной группой (46.96±14.95%, n=22, p=0.001). Кроме того, по сравнению с контрольной группой (32.88±15.67%, n=22), крысы, жившие в условиях обогащенной среды, проявляли гораздо более высокую активность в центре бокса (50.32±17.34%, n=26, p=0.001), пересекая и исследуя центральную зону «открытого поля» (Рис.9; Б). Скорость движения животных, живших в условиях обогащенной среды, в центре и у стенок бокса была значительно выше (Me (Q1-Q3): 17.25 (11.25-23.53), см/сек, n=26), чем у животных контрольной группы (9.45(5.70-13.58), см/сек, n=22, p=0.0002). Содержание животных в условиях обогащенной среды не повлияло на количество фекальных болюсов.

По результатам оценки поведения в тесте «открытое поле» можно сделать вывод о том, что для животных, которых содержали в условиях обогащенной среды, новая обстановка является менее стрессогенным фактором. Крысы, которых содержали в условиях обогащенной среды, проявляли более высокий уровень любопытства и исследовательской активности, о чем свидетельствует увеличение активности в центре и у стенок «открытого поля». Несмотря на то, что животные контрольной группы проводили больше времени в центре бокса, они в отличие от крыс, живших в условиях обогащенной среды, не проявляли исследовательского интереса, а, напротив, демонстрировали признаки тревоги в ответ на новую обстановку.

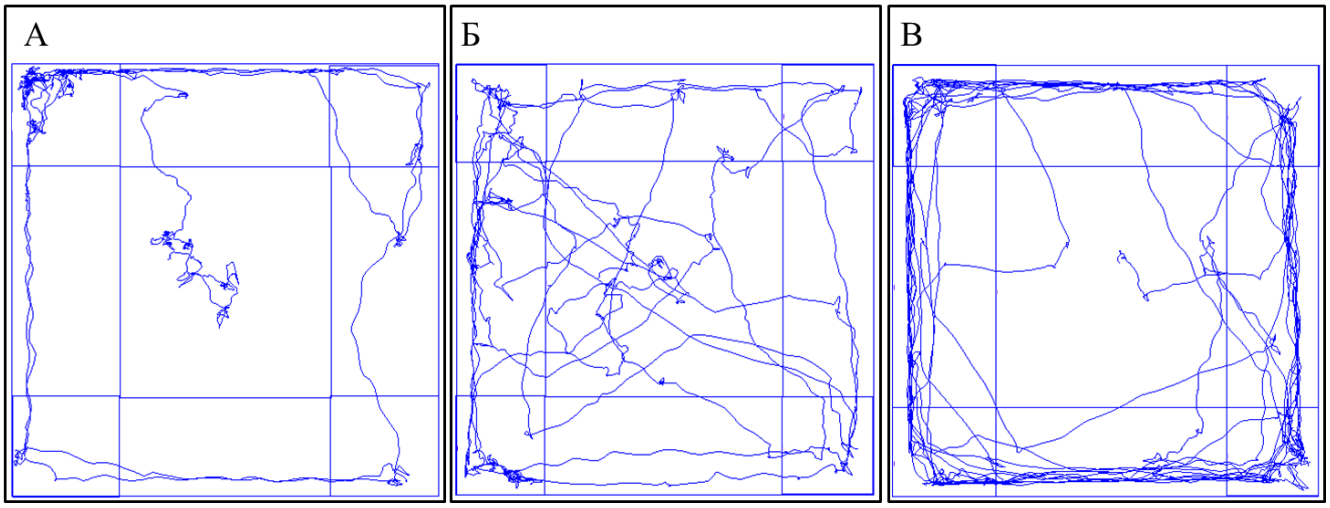


Рисунок 9. Тест «открытое поле». Характерные индивидуальные треки животных из разных экспериментальных групп. А – стандартные условия содержания, Б – содержание в условиях обогащенной среды, В – пероральное введение ингибитора обратного захвата норадреналина.

По результатам оценки поведения крыс, которым перорально вводили ингибитор обратного захвата норадреналина, оказалось, что активность и трек этих животных в тесте «открытое поле» значительно отличается от крыс контрольной группы (Рис.9; В). В частности, у этих крыс возросла локомоторная активность, об этом свидетельствует увеличение общей длины трека (2463±1023.14 см, n=23) за счет большей дистанции пройденной животными у стенок и в углах бокса по сравнению с контрольной группой (1831.20±867.20 см, n=22, p=0.037). Крысы после курса атомоксетина более активно исследовали области у стенок бокса (56.19±10.22%, n=23) по сравнению с животными, которых содержали в стандартных условиях (46.96±14.95%, n=22, p=0.024). Скорость движения в области стенок бокса у животных, которым вводили атомоксетин, была выше (Me (Q1-Q3): 12.90 (9.55-15.30), см/сек, n=23), чем у

крыс контрольной группы (9.45 (5.70-13.58), см/сек, n=22, p=0.035). Активность крыс, которым вводили атомоксетин, в центральной зоне «открытого поля» была такой же, как и у животных контрольной группы. Обращает на себя внимание тот факт, что у животных, которым перорально вводили атомоксетин, имеется тенденция к уменьшению времени задержки в центральной зоне бокса на начальном этапе тестирования (Me (Q1-Q3)): 30.95 (14.23-42.63) секунд, n=23, по сравнению с контрольной группой: 35.55 (23.38-67.90) секунд, n=22, p=0.16. Такой результат может свидетельствовать об уменьшении стрессогенности новой обстановки и социальной изоляции для животных, которым перорально вводили ингибитор обратного захвата норадреналина. Более того, мы обнаружили, что у крыс, которым вводили атомоксетин, при помещении в центр «открытого поля» значительно реже происходили акты дефекации (0.85±1.53 фекалии на эксперимент, n=23) по сравнению с животными контрольной группы (3.25±2.15 фекалии на эксперимент, n=22, p=0.0002). Этот факт служит дополнительным признаком значительно меньшей тревожности и эмоциональной реакции животных в ответ на новую обстановку.

Таким образом, крысы, которым вводили атомоксетин, продемонстрировали поведение, которое характеризуется меньшим уровнем эмоциональной реакции на стрессогенную обстановку, более высокой локомоторной активностью и признаками более активного исследовательского поведения. Тем не менее, как и контрольная группа, крысы которым вводили атомоксетин, не слишком активно исследовали центральную зону «открытого поля», по сравнению с животными, которых содержали в условиях обогащенной среды. Очевидно, что содержание животных в условиях обогащенной среды представляет собой стимулирующее воздействие на головной мозг множества факторов и не ограничивается лишь влиянием норадренергической системы. Поэтому само по себе усиленное действие норадреналина способно лишь отчасти имитировать благотворное влияние факторов обогащенной среды на головной мозг животных.

Активация астроглиальных α1-адренорецепторов норадреналином улучшает когнитивные способности животных

Мы оценивали способность крыс обучаться и формировать пространственную память в лабиринте К. Барнс для того чтобы проверить вызывает ли воздействие факторов обогащенной среды на головной мозг животных улучшение когнитивных функций. В качестве показателей для оценки способности крыс к обучению и формированию пространственной памяти были использованы длина трека, скорость движения животных в лабиринте, время, затраченное на поиск убежища и стратегия поиска убежища.

По результатам тренировки пространственной памяти животных в лабиринте К. Барнс мы обнаружили, что крысы, жившие в условиях обогащенной среды, справлялись с поиском убежища гораздо быстрее, чем животные контрольной группы (Рис.10). В частности, животные, которых содержали в условиях обогащенной среды, находили убежище в лабиринте быстрее, чем крысы контрольной группы в ходе 6 из 8 тренировок памяти, включая самую первую тренировку. Первая тренировка крыс в лабиринте, прежде всего, позволяет оценить способность животных к ориентировке в условиях нового окружения. При изучении видеозаписей первой тренировки животных, которых содержали в стандартных условиях, обращает на себя внимание их медлительное и тревожное поведение по сравнению с группой, жившей в условиях обогащенной среды. Нередко в ходе первых 2-3 тренировок мы наблюдали, что, даже обнаружив убежище, животные контрольной группы не сразу решались в него проникнуть или не заходили в него вовсе. В отличие от них крысы, жившие в условиях обогащенной среды, незамедлительно проникали в убежище при его обнаружении.

Оказалось, что пероральное введение атомоксетина животным в течение 14 дней существенно повлияло на их поведение в лабиринте К. Барнс. Животные, которым вводили атомоксетин, быстрее справились с поиском убежища в лабиринте на первой и третьей тренировках по сравнению с крысами контрольной группы (Рис.10). Кроме того, имеется тенденция к тому, что на пятой тренировке крысы, которым вводили атомоксетин, также

быстрее находили убежище (24.97±13.98 сек, n=23) по сравнению с контролем (34.05±24.22 сек, n=21, p=0.14). В ходе первой тренировки в лабиринте К. Барнс крысы, которым вводили атомоксетин, продемонстрировали меньше признаков тревоги при помещении в центр лабиринта по сравнению с контрольной группой. В начале первой тренировки крысы после курса атомоксетина практически не замирали, сразу покидали центр и начинали спокойно исследовать края лабиринта, при этом, обнаружив убежище, они незамедлительно в него проникали. Стоит отметить, что животные, которым вводили атомоксетин, быстрее справлялись с поиском убежища в первую очередь за счет уменьшения длины трека, но не скорости движения, в отличие от крыс, живших в условиях обогащенной среды.

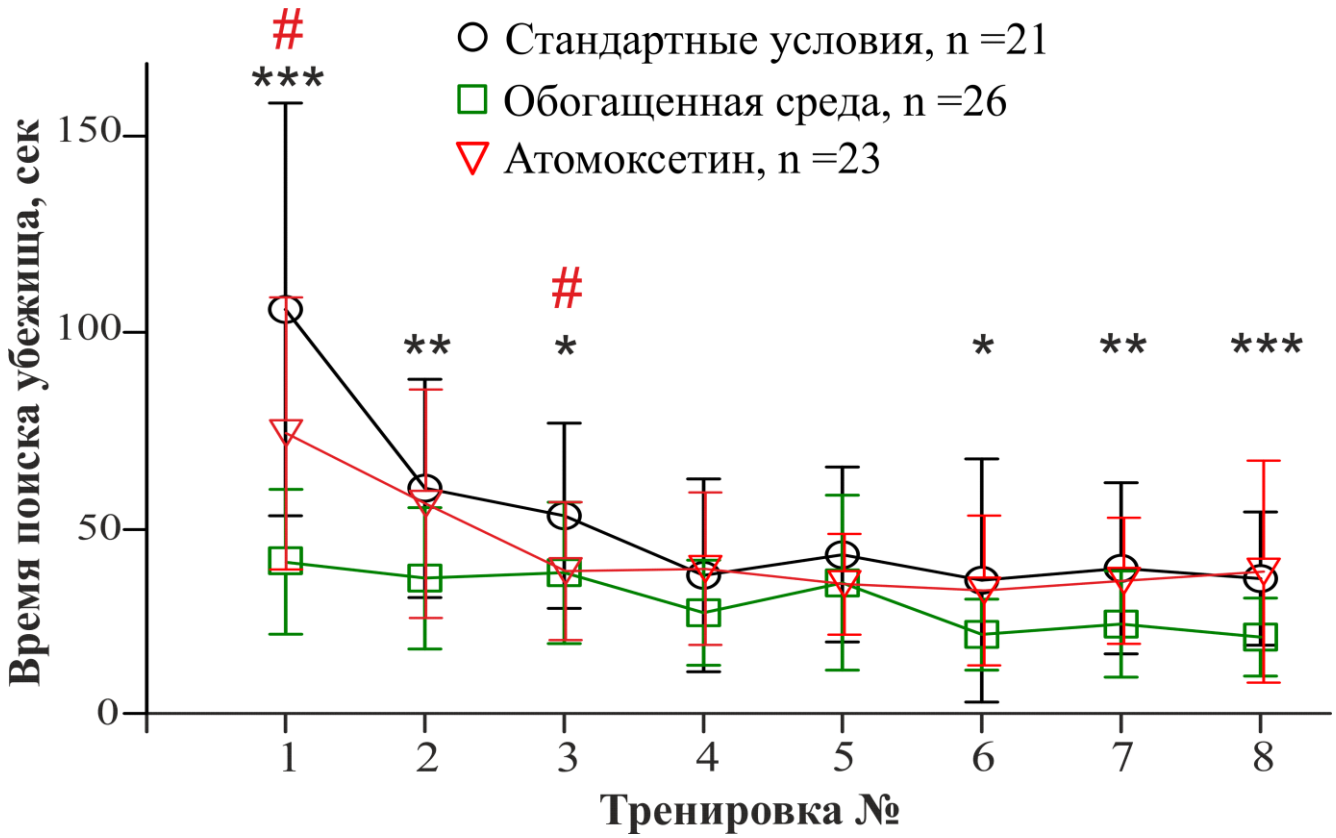


Рисунок 10. Время, за которое животные, жившие в условиях обогащенной среды и крысы, которым вводили атомоксетин, находили убежище в лабиринте К. Барнс по сравнению с контрольной группой; отражает скорость обучения и тренировки пространственной памяти в динамике. * Для сравнения контрольной группы, с группой животных, которых содержали в условиях обогащенной среды. Где *- p≤0.05, **- p≤0.01, ***- p≤0.001. # Для сравнения контрольной группы с группой крыс, которым вводили атомоксетин. Где #- p≤0.05.

Для того чтобы оценить способность животных к формированию пространственной памяти, мы оценивали стратегии, которые крысы использовали для поиска убежища в лабиринте К. Барнс. В ходе тренировок памяти мы наблюдали у животных изменение стратегий поиска убежища: от случайного поиска, когда животное просто обследует отверстия случайным образом, пересекая центр лабиринта, к последовательному поиску убежища по кругу лабиринта и далее, к использованию пространственной памяти. При сравнении частоты, с которой животные демонстрировали поиск убежища с использованием пространственной памяти в нашем эксперименте, оказалось, что у крыс, живших в условиях обогащенной среды, действительно, лучше формируется пространственная память по сравнению с контрольной группой (p=0.001 для критерия χ^2 Фишера). У животных, которых содержали в условиях обогащенной среды, уже начиная с 3 тренировки, формировалась устойчивая пространственная память. Более того, эта группа крыс продемонстрировала гораздо более динамичную смену стратегий поиска убежища (Рис.11).

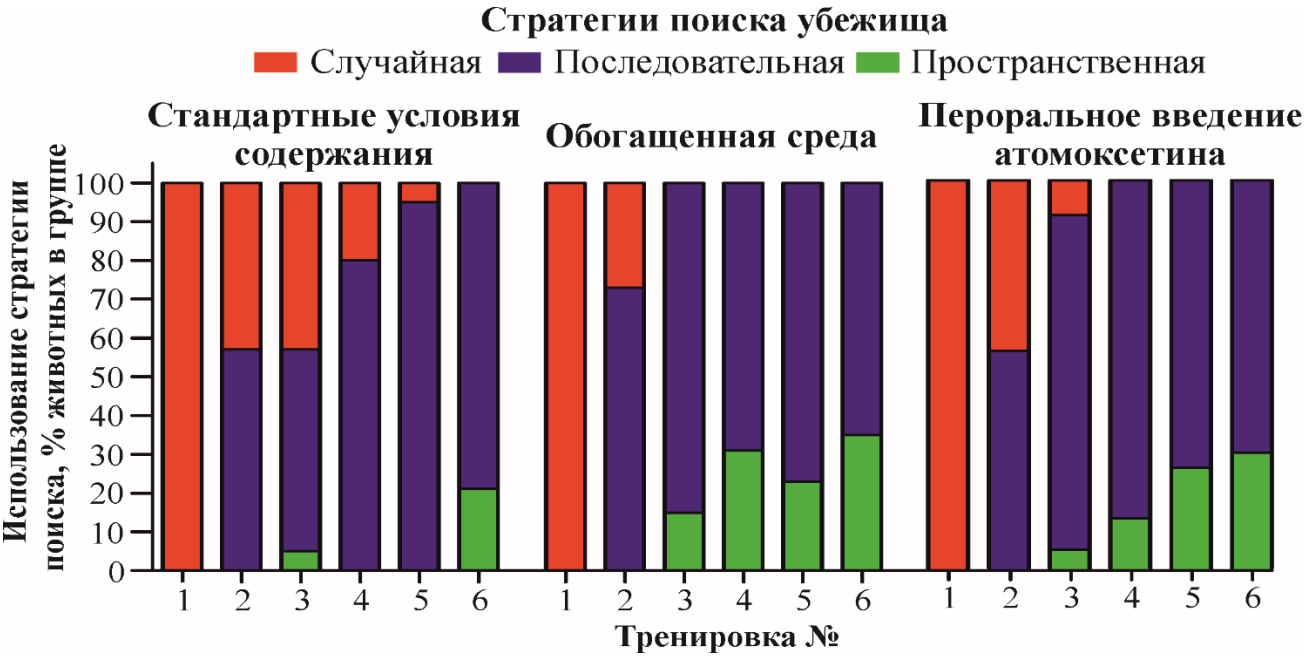


Рисунок 11. Динамика использования стратегий поиска убежища в ходе тренировок пространственной памяти у животных из разных экспериментальных групп.

При оценке стратегий поиска, которые использовали крысы после курса ингибитора обратного захвата норадреналина, мы не обнаружили статистически значимых различий в частоте использования пространственной памяти этих животных по сравнению с контрольной группой. По результатам нашего исследования мы можем говорить лишь об имеющейся тенденции к увеличению частоты использования пространственной памяти для поиска убежища ($p=0.14$ для критерия χ^2 Фишера). Тем не менее, обращает на себя внимание тот факт, что у животных, которым вводили атомоксетин, более динамично происходила смена стратегий поиска убежища (Рис.11). В частности, животные после курса атомоксетина быстрее, чем крысы контрольной группы понимали, что убежище расположено в области края лабиринта. При этом стратегия поиска убежища у этих животных быстрее менялась со случайной на последовательную. Такой результат вкупе с меньшим количеством времени, которое понадобилось животным для поиска убежища (Рис.10), указывает на улучшение обучаемости и когнитивной гибкости животных под действием малых доз атомоксетина. Имеются сведения об исследованиях других научных групп, которые также подтверждают, что введение крысам малых доз атомоксетина (0.1 мг/кг) способствует улучшению когнитивной гибкости [Bradshaw S.E. et al., 2016; Cain R.E. et al., 2011]. Считается, что основным механизмом, за счет которого достигается улучшение когнитивной гибкости при приеме атомоксетина, является увеличение концентрации норадреналина в префронтальной коре головного мозга [Cain R.E. et al., 2011; Bymaster F.P. et al., 2002].

Нам также удалось обнаружить, что под действием атомоксетина крысы быстрее привыкали к аверсивной обстановке. После шестой тренировки мы наблюдали, как животные начинали смело исследовать лабиринт, переставали целенаправленно искать убежище и даже при его обнаружении не проникали внутрь, продолжая двигаться различным зонам лабиринта. Такого быстрого привыкания у животных из других экспериментальных групп мы не наблюдали. На основании этих наблюдений в совокупности с результатами тестирования животных в «открытом поле» мы предположили, что пероральное введение малых доз атомоксетина в течение 14 дней может обладать анксиолитическим эффектом.

Таким образом, согласно результатам наших экспериментов действие факторов обогащенной среды на головной мозг животных стимулирует развитие когнитивных функций. Крысы, которых содержали в условиях обогащенной среды, продемонстрировали лучшую способность к обучению, чем животные, жившие в стандартных условиях вивария. Более того, по результатам тренировок с использованием лабиринта К. Барнс оказалось, что у крыс,

которых содержали в условиях обогащенной среды, лучше формируется пространственная память по сравнению с контрольной группой. Пероральное введение животным атомоксетина в малых дозах в течение 14 дней также оказывает существенное влияние на когнитивные способности животных. Согласно проведенному анализу стратегий, которые были использованы крысами для поиска убежища в лабиринте, мы не можем сказать, что у животных, которым вводили атомоксетин, улучшилась пространственная память по сравнению с контрольной группой. Тем не менее, нам удалось обнаружить, что животные, которым вводили атомоксетин, продемонстрировали более высокую когнитивную гибкость и лучшую способность к обучению.

ВЫВОДЫ

1. Содержание крыс в условиях обогащенной среды вызывает увеличение плотности норадренергических волокон; приводит к ингибированию тормозной и активации возбуждающей синаптической передачи, а также облегчает индукцию долговременной потенциации синапсов в гиппокампе и соматосенсорной коре головного мозга животных.
2. Норадреналин активирует Ca^{2+}-сигнализацию в астроцитах коры головного мозга крыс действуя на α1-адренорецепторы. Активация кальциевой сигнализации в астроцитах приводит к экзоцитозу глиотрансмиттеров (АТФ, глутамат, D-серин), которые ингибируют тормозную и потенцируют возбуждающую синаптическую передачу. Смещение баланса синаптической передачи в сторону возбуждения облегчает индукцию долговременной потенциации синапсов гиппокампа и соматосенсорной коры.
3. Активное исследовательское поведение, высокая когнитивная гибкость и улучшение когнитивных способностей животных, которых содержали в условиях обогащенной среды, наиболее вероятно связаны с облегчением индукции долговременной потенциации синапсов в соматосенсорной коре и гиппокампе крыс.
4. Пероральное введение крысам малых доз атомоксетина в течение 14 дней ингибирует тормозную синаптическую передачу, облегчает долговременную потенциацию синапсов гиппокампа и коры головного мозга, а также частично улучшает когнитивные способности подобно тому, что наблюдается у животных под действием факторов обогащенной среды.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова: МГУ.03.06 по специальностям 03.03.01 – «физиология» и 03.03.06 – «нейробиология»:

1. Lalo U., **Bogdanov A.**, Pankratov Y. Diversity of astroglial effects on aging- and experience-related cortical metaplasticity// Frontiers in molecular neuroscience – 2018. – V. (11), P. 239-243. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00239, (**IF=3.72, Scopus, WoS)**.
2. Pankratov Y., **Bogdanov A.**, Lalo U. Age- and experience-related plasticity of ATP-mediated signalling in the neocortex // Frontiers in cellular neuroscience – 2019. – V. (13), P. 242-256. DOI: 10.3389/fncel.2019.00242, (**IF=3.9, Scopus, WoS)**.
3. Lalo U., **Bogdanov A.**, Moss, G. W., Frenguelli, B. G., Pankratov, Y. Role for Astroglia-Derived BDNF and MSK1 in Homeostatic Synaptic Plasticity // Neuroglia/Brain Sciences – 2018. – V. 1(2), P. - 381-394. DOI:10.3390/neuroglia1020026, (**IF=2.79, Scopus, WoS)**.

Тезисы конференций и статьи в сборниках:

1. 2019 Норадреналин модулирует пластичность синапсов путем активации астроглии
   Авторы: **Богданов А.О.**, Сербина А.В., Прокудина Д.В., Панкратов Ю.В.
   X Международная конференция Рецепторы и внутриклеточная сигнализация, Пущино, Россия, 20-24 мая 2019
2. 2019 Норадреналин активирует нейрон-глиальные взаимодействия и увеличивает эффективность возбуждающей синаптической передачи
   Авторы: **Богданов А.О.**, Сербина А.В., Прокудина Д.В., Панкратов Ю.В.
   VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, Кольцово, Россия, 22-25 октября 2019
3. 2019 Astroglial adrenergic receptors in glia-neuron communications
   Авторы: Pankratov Y., **Bogdanov A.**, Lalo U.
   7th Mediterranean Neuroscience Conference (23-27 June, 2019, Marrakech, Morocco), Марракеш, Марокко, 23-27 июня 2019
4. 2018 Феномен медленных входящих токов, возникающих в результате нейрон-глиальных взаимодействий
   Авторы: **Богданов А.О.**, Панкратов Ю.В.
   Региональный форум молодых ученых «ХимБиоSeasons», Калининград, Россия, 21 апреля 2018